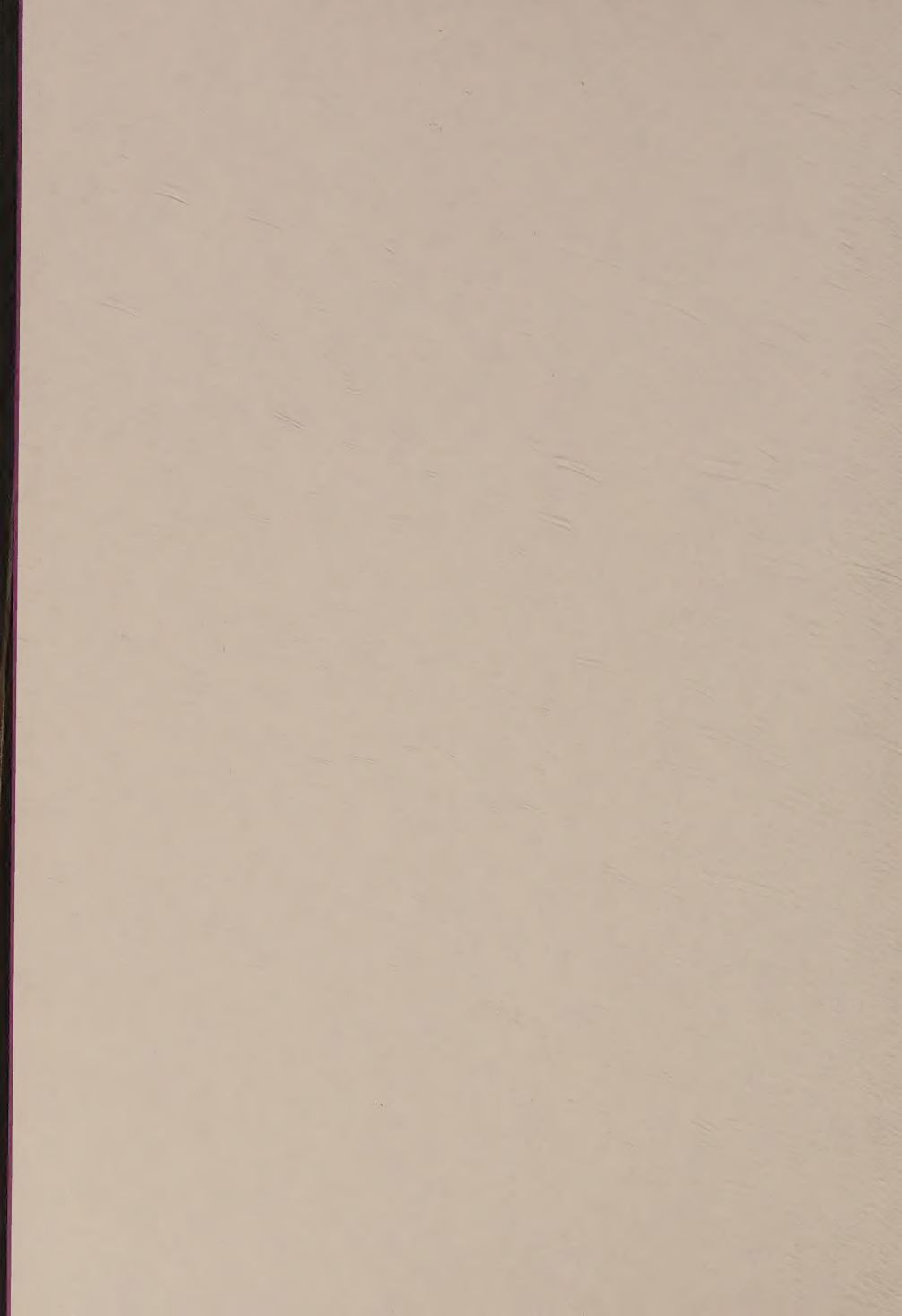


**DIE WIRKUNG VON VITAMIN D3-METABOLITEN
AUF EIPARAMETER BEI LEGEHENNE
UND LEGEWACHTEL**

Michael Lehner

Disbui. München

1989



Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

**DIE WIRKUNG VON VITAMIN D₃-METABOLITEN
AUF EIPARAMETER BEI LEGEHENNE UND LEGEWACHTEL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michael Lehner
aus
Lindenberg im Allgäu

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND FACHBEGRIFFE

1.1. BILDMATERIAL

1.1.1. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.2. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.3. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.4. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.5. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.6. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.7. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.8. Bildmaterial - Zusammenfassung

1.1.9. Bildmaterial - Zusammenfassung

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

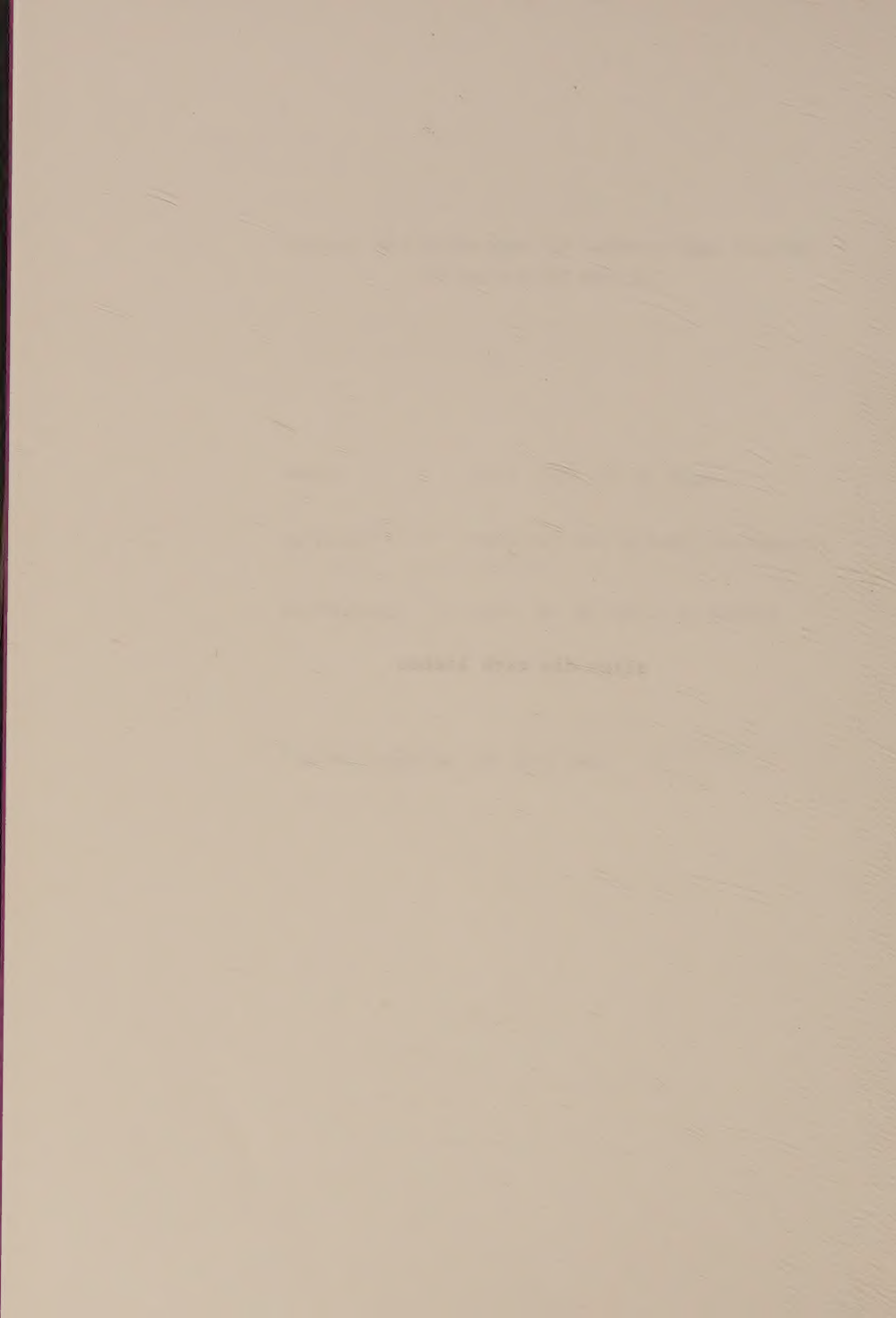
1.1. Zusammenfassung und Zusammenfassung

1.2. Zusammenfassung

1.3. Zusammenfassung und Zusammenfassung

1.4. Zusammenfassung und Zusammenfassung

1.5. Zusammenfassung



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Vitamin D-Stoffwechsel - Besonderheiten beim Vogel	3
2.2. 26,27-Hexadeutero-1,25-(OH) ₂ -D ₃ als neuer synthetischer Vitamin D ₃ -Metabolit	10
2.3. Faktoren, die die Legeleistung und Eischalenqualität beim Legehuhn beeinflussen	11
2.3.1. Alimentäre Faktoren	11
2.3.2. Genetische Faktoren	14
2.3.3. Umwelt- und Managementfaktoren	14
2.3.4. Mauser	18
2.3.5. Infektionskrankheiten	18
2.3.6. Vitamin D-Versorgung und Vitamin D-Metaboliten als Futterzusatzstoffe	19

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. WACHTELVERSUCH	22
3.1. Tiermaterial und Haltungsform	22
3.2. Versuchsfutter	22
3.3. Methodik des Wachteleischalentests	25
3.4. Versuchsdurchführung	26
3.5. Ergebnisse	28

4. HÜHNERVERSUCH	30
4.1. Tiermaterial und Haltungsform	30
4.2. Versuchsfutter	31
4.3. Bestimmung der Legeparameter	33
4.4. Bestimmung der Eiparameter	33
4.5. Bestimmung des Körpergewichts	36
4.6. Bestimmung der relativen Knochenasche	36
4.7. Bestimmung der Blutparameter	37
4.8. Bestimmung des Calcium Binding Proteins (= CaBP)	39
4.9. Versuchsdurchführung	41
4.10. Einteilung der Versuchsgruppen	42
4.11. Ergebnisse	43
5. DISKUSSION	53
5.1. Die biologische Aktivität des 26,27-Hexadeutero- -1,25-(OH) ₂ -D ₃	53
5.2. Die Wirkung von Vitamin C-Zusätzen auf die biolo- gische Aktivität von Vitamin D ₃ -Metaboliten	57
5.3. Der Einsatz von Vitamin D ₃ -Metaboliten mit und ohne Vitamin C-Zusatz im Legehennenversuch	59
6. ZUSAMMENFASSUNG	71
7. SUMMARY	73
8. LITERATURVERZEICHNIS	75

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

ZUCKER und GROPP (1968) entwickelten einen Wachteleischalentest, der es erlaubt, die antirachitische Wirksamkeit von Vitamin D₃-aktiven Verbindungen zu bestimmen.

Aber nicht nur von Vitamin D₃, sondern auch von seinen natürlichen Metaboliten, und von synthetischen Vitamin D₃-Analoga läßt sich so die biologische Aktivität ermitteln (RAMBECK et al., 1985; RAMBECK et al., 1986).

Unter den Vitamin D₃-Metaboliten sind vor allem jene interessant, die, verglichen mit dem natürlichen Steroidhormon 1,25-(OH)₂-D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol), eine größere therapeutische Breite besitzen. Dabei sind möglicherweise auch Kombinationen von Vitamin D₃-Metaboliten untereinander von Bedeutung.

So konnte gezeigt werden, daß bei der gemeinsamen Verabreichung von 1,25-(OH)₂-D₃ mit 24,25-(OH)₂-D₃ (24,25-Dihydroxycholecalciferol) und auch von 1,25-(OH)₂-D₃ mit 1,24,25-(OH)₃-D₃ (1,24,25-Trihydroxycholecalciferol) im Wachteleischalentest und in anderen Vitamin D₃-Tests synergistische Effekte auftraten (RAMBECK et al., 1985; RAMBECK et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der von USKOKOVIC et al. (1988) neu entwickelte, synthetische Vitamin D₃-Metabolit 26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol im Vergleich mit 1,25-(OH)₂-D₃ im Wachteleischalentest auf seine biologische Wirksamkeit getestet werden.

Weiterhin sollte die von WEISER und SCHLACHTER (1986), WEISER et al. (1988) und WEISER et al. (1989) beschriebene positive Beeinflussung des Vitamin D₃-Stoffwechsels durch Vitamin C im Wachteleischalentest geprüft werden.

Im umfangreicheren zweiten Teil dieser Untersuchung sollte der Einfluß verschiedener Vitamin D₃-Metabolite und Metabolitkombinationen auf die Eischalenqualität und die Legeleistung bei alten Legehennen untersucht werden.

Weltweit entsteht großer wirtschaftlicher Verlust durch den Rückgang der Legeleistung und die abnehmende Eischalenqualität am Ende der Legeperiode. Allein in den USA wird dieser Verlust auf 100 Millionen Dollar pro Jahr geschätzt (HAMILTON, 1982). Dies entsteht, obwohl die Legehennen ausreichend (2 000 IE / kg Futter) mit Vitamin D versorgt sind. Da der Calcium-homeostase, und damit dem Vitamin D₃ und seinen Metaboliten, eine Schlüsselrolle bei der Eischalencalcifizierung zukommt, sollte der Einfluß von Vitamin D₃-Metaboliten in der Diät der Legehennen auf die Eischalenqualität und die Legeleistung geprüft werden. Untersucht wurden dabei 1,25-(OH)₂-D₃ und Kombinationen von 1,25-(OH)₂-D₃ mit 1,24,25-(OH)₃-D₃, 1,25-(OH)₂-D₃ mit 1,24,25-(OH)₃-D₃ und Vitamin C, sowie die Kombination von 24,25-(OH)₂-D₃ mit Vitamin C.

Neben den üblichen Eischalen- und Legeleistungsparametern wurden Blutwerte (Ca, P, alk. P-ase), CaBP, Körpergewicht und Knochenasche bestimmt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Vitamin D-Stoffwechsel - Besonderheiten beim Vogel

Vitamin D bleibt nur noch insofern historisch ein Vitamin nach der klassischen Vitamindefinition, als es bei allen höher entwickelten Lebewesen - auch bei Vögeln - nur teilweise essentiell ist. Es wird zu 70 bis 90 % im Körper selbst gebildet (FLURY und HALDIMANN, 1981).

Neben dem im tierischen Organismus vorkommenden Vitamin D₃, das im Stratum germinativum der Haut unter UV-Strahlung der Sonne aus 7-Dehydrocholesterol gebildet wird, existiert ein Vitamin D₂, das aus dem Ergosterol der Pflanze durch UV-Strahlung erzeugt wird.

Vitamin D₂ und D₃ weisen beim Vogel, im Gegensatz zu den Säugern, grundsätzliche Verschiedenheiten in der biologischen Wirksamkeit auf. Die Aktivität von Vitamin D₂ beträgt beim Vogel nur ein Zehntel der Aktivität von Vitamin D₃ (NORMAN, 1979).

NORMAN (1987) vermutet daher, daß die beiden Vitamin D-Formen einen verschiedenen metabolischen Abbau haben müssen.

DeLUCA et al. (1988) weisen beim Huhn mit Hilfe von radioaktiv markiertem 25-(OH)-26,27-Tritium-cholecalciferol und 25-(OH)-26,27-Tritium-ergocalciferol nach, daß Ergocalciferol im Vergleich zu Cholecalciferol kaum an das Vitamin D-Binding-Protein (DBP) im Plasma angelagert wird. Dies könnte die geringere biologische Aktivität von Vitamin D₂ beim Vogel erklären.



Die Vitamin D-Wirkungsweise wird allgemein mit der eines Steroidhormones verglichen, da sich die metabolisch wirksame Form $1,25-(OH)_2-D_3$ ähnlich wie die klassischen Steroidhormone Glucocorticoide, Östrogene, Progesterone, Testosterone und Aldosterone verhält und auch eine dem Cortisol ähnliche chemische Struktur aufweist (NORMAN et al., 1982; WALTERS, 1985).

Vitamin D_3 und D_2 werden im Blutgefäßsystem an ein Vitamin D-bindendes Protein (DBP) gebunden (BOUILLON and VAN BAELEN, 1981) und zur Leber transportiert.

Hier wird das Vitamin D am C 25-Atom hydroxyliert. Dieser Schritt wird vermutlich nicht durch einen feed-back-Mechanismus reguliert (COHEN et al., 1978). Im Plasma kommt diese $25-(OH)-D_3$ -Form von allen Metaboliten in höchster Konzentration vor.

In der Niere findet die zweite Hydroxylierung zu den zwei im Körper wirksamen Formen statt, wobei dieser Schritt durch den Calciumstoffwechsel reguliert wird (COHEN et al., 1978).

Bei Calciummangelsituationen steigt nach HENRY and NORMAN (1974) und WILSON and LAWSON (1978) die Aktivität der 25-Cholecalciferol-1-hydroxylase in der Niere. Gleiches beobachteten SPENCER et al. (1978) bei Vitamin D-Mangel.

Mit einer Hydroxylierung durch die 25-Hydroxyvitamin D-1-hydroxylase am C 1-Atom entsteht das 1,25-Dihydroxycholecalciferol und mit einer Hydroxylierung am C 24-Atom durch eine 25-Hydroxyvitamin-D-24-hydroxylase das 24,25-Dihydroxycholecalciferol.

Beim Geflügel sind nach NORMAN (1987) 16 Vitamin D-Metabolite beschrieben, wobei die meisten wahrscheinlich nur stoffwechselkatabole Produkte von geringer biologischer Bedeutung sind (JARNAGIN et al., 1985).

Die beiden wichtigsten Vitamin D-Metaboliten sind aber $1,25-(OH)_2-D_3$ und $24,25-(OH)_2-D_3$. Beide werden an der "Verzweigungsstelle Niere" gebildet, wobei $1,25-(OH)_2-D_3$ sowohl beim Vogel, als auch beim Säuger eine renale $25-(OH)-D_3$ -24-Hydroxylase und damit die Bildung von $24R,25-(OH)_2-D_3$ induziert (HENRY and NORMAN, 1974; HENRY, 1981). Unter normaler Stoffwechsellaage werden die beiden Metaboliten koproduziert, da bei normalem Calciumgehalt in der Ration die $1,25-(OH)_2-D_3$ -Produktion gedrosselt wird und mehr $24R,25-(OH)_2-D_3$ produziert wird (HOLICK et al., 1972).

Neben der Bildung in der Niere sind auch extrarenale C 24-Hydroxylasen in Knorpeln und Knochen (GARABEDIAN et al., 1978) und in der Dünndarmmucosa (KUMAR et al., 1978) nachgewiesen worden.

Für die biologische Umsetzung von $1,25-(OH)_2-D_3$ und $24R,25-(OH)_2-D_3$ in den Zielorganen existieren, gemäß ihrem Steroidcharakter, Rezeptoren in der Zelle, die über eine mRNA-Produktion die Reaktion in die Zelle vermitteln.

Solche Rezeptoren sind beim Huhn für Darm, Niere, Knochen, Nebenschilddrüse, Pancreas, Chorionallantois-membran, Eischalendrüse und Hypophysenvorderlappen nachgewiesen worden (NORMAN et al., 1982; HENRY and NORMAN, 1984).

Im Darm des Huhnes induziert $1,25-(OH)_2-D_3$ die Bildung einer mRNA, die für ein 28 000 Dalton großes Vitamin D-abhängiges Calcium-Binding Protein (CaBP) - auch Calbindin 28 K genannt - kodiert (CHRISTAKOS and NORMAN, 1980).

Dieses CaBP wurde erstmals von WASSERMAN and TAYLOR (1966) beschrieben und kommt in vielen Organen und Geweben vor, wobei die Säuger gegenüber dem Vogel ein erheblich kleineres CaBP mit nur 10 000 Dalton (Calbindin 10 K) haben (FULLMER and WASSERMAN, 1973; FULLMER and WASSERMAN, 1975).

Das CaBP des Vogels wurde von WASSERMAN and CORRADINO (1973) exakt beschrieben und von MORRISEY et al. (1978) in einen ursächlichen Zusammenhang mit der Calciumabsorption gebracht.

Für den Calciumeinbau in die Eischale wurde von CORRADINO et al. (1968) und FULLMER et al. (1976) ein gleiches oder ähnliches CaBP in der Eischalendrüse der Legehenne beschrieben.

Dieses CaBP kann vor allem während der Calciumabgabe in die Eischale bei der Eiproduktion nachgewiesen werden. Es wird in der Eischalendrüse junger Vögel mit Beginn der Legereife gebildet (BAR and HURWITZ, 1973) und ist bei Sistieren der Eiablage nicht mehr nachzuweisen (BAR et al., 1978a).

BAR et al. (1984) stellen später jedoch fest, daß die Konzentration von CaBP in der Eischalendrüse, ebenso wie die $1,25-(OH)_2-D_3$ -Konzentration im Plasma und in der Eischalendrüse, bei der adulten Legehenne immer gleich hoch ist, unabhängig davon, ob die Eischalendrüse Eischale bildet oder inaktiv ist.

Aus diesen Versuchen postulierte die Arbeitsgruppe um BAR, daß die Eischalendrüse nicht von $1,25-(OH)_2-D_3$ reguliert wird.

Dies könnte daran liegen, daß die Eischalendrüse weniger und nicht so spezifische Chromatin-Rezeptoren für $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ enthält (COTY, 1980; AMEENUDDIN et al., 1987).

Neben den $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Rezeptoren für das CaBP existieren auch noch $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Rezeptoren für eine alkalische Phosphatase (NORMAN et al., 1970) und eine calciumabhängige ATPase (MELANCON and DeLUCA, 1970) in der Basalmembran der Darmzellen.

Die sehr hohe Spezifität des $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Rezeptors im Darm - nur Secosteroide mit einer der drei entscheidenden OH-Gruppen am C 1-Atom, am C 24-Atom oder am C 25-Atom mit der richtigen Seitenkettenlänge werden akzeptiert - und die extrem hohe Affinität des Rezeptors wurden von WECKSLER et al. (1978) festgestellt.

In einem Arbeitsmodell von NORMAN (1987) werden dem Calbindin 28 K zwei Eingriffsmöglichkeiten zugewiesen. Es wirkt als zelluläres Element in den intrazellulären Vesiceln, um Calcium zu binden und durch die Zelle zu transportieren. Außerdem schützt es als intrazelluläres Kompartiment den Intrazellulärraum vor einer zu hohen, eventuell toxischen Calciumkonzentration.

Die Wirkung von $24\text{R},25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ - und ob sie überhaupt isoliert existiert - wird von verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedlich erklärt.

Die Gruppe um DeLUCA postuliert, ausgehend von Versuchen mit $24,24\text{-difluoro-}25-(\text{OH})\text{-D}_3$ bei der Ratte (BROMMAGE et al., 1983), daß die 24R -Hydroxylierung keine biologische Wirkung hat, sondern vielmehr ein kataboler Schritt ist.

GRAY et al. (1983) stellen fest, daß die Ratte auch bei völliger Vitamin D-Abwesenheit wachsen und sich fortpflanzen kann.

Damit ist die Nutzung der Ratte als Versuchstier für Studien der biologischen Wirksamkeit von $24R,25-(OH)_2-D_3$ nach NORMAN (1987) eingeschränkt.

Die Gruppe um NORMAN zeigt durch eine Versuchsreihe mit Vögeln (HENRY et al., 1977; HENRY and NORMAN, 1978; NORMAN et al., 1980; MALLUCHE et al., 1980; NORMAN et al., 1983), daß für die Erzeugung aller Vitamin D-Wirkungen über einen vollen Lebens- und Reproduktionszyklus hinweg sowohl $1,25-(OH)_2-D_3$ als auch $24,25-(OH)_2-D_3$ vorhanden sein müssen. Sie weisen die Notwendigkeit von täglichen Dosen beider Metaboliten für eine gute Schlupfrate der Eier bei der Legehenne nach. Außerdem beweisen sie, daß von den beiden Stereoisomeren $24R,25-(OH)_2-D_3$ und $24S,25-(OH)_2-D_3$ nur die $24R$ -Form wirksam ist.

NORMAN (1987) stellt zur Diskussion, ob die $24R,25-(OH)_2-D_3$ -Wirkung beim Vogel eine größere Bedeutung als beim Säuger hat, oder vielleicht auch nur besser zu Tage tritt, weil der Vogel wirksamer und besser depletierbar ist.

Für die biologische Umsetzung der $24R,25-(OH)_2-D_3$ -Wirkung im Zielorgan sind beim Vogel rezeptorähnliche Proteine bekannt, die in den Chondrozyten (CORVOL et al., 1979), im enchondralen Knochen (SOMJEN et al., 1982) und in der Parathyreoidea (MERKE and NORMAN, 1981) nachgewiesen werden können.

Der Abbau von $1,25-(OH)_2-D_3$ und $24R,25-(OH)_2-D_3$ beim Vogel findet über den gleichen Stoffwechselweg statt. Am $1,25-(OH)_2-D_3$ wird zuerst eine C 24-Hydroxylierung durchgeführt, dann erfolgt an beiden Metaboliten eine 24-oxo-Bildung (MAYER et al., 1983; NAPOLI et al., 1983; YAMADA et al., 1983). Anschließend wird das C 23-Atom hydroxyliert, und eine Seitenkettenumlagerung findet statt (HARNDEN et al., 1976; KUMAR et al., 1976).

Dies erzeugt im Falle des $1,25-(OH)_2-D_3$ einen Metaboliten mit C 23-Carboxygruppe und im Falle des $24R,25-(OH)_2-D_3$ einen Metaboliten mit C 23-Alkoholgruppe.

Die Fähigkeit zum Abbau besitzen alle Zielorgane für $1,25-(OH)_2-D_3$ und $24R,25-(OH)_2-D_3$. In verschiedenen Geweben wurde von HAUSSLER et al. (1986) bereits eine induzierbare C 24-Hydroxylase nachgewiesen.

Außerdem wurde noch ein zweiter Abbauweg für $1,25-(OH)_2-D_3$ und $25-(OH)-D_3$ beschrieben (WICHMANN et al., 1979; OHNUMA et al., 1980; TANAKA et al., 1980), der in einem einheitlichen C 26 - C 23-Lakton endet, dessen genaue Bedeutung jedoch noch nicht bekannt ist.

Beim Abbau von 24-oxo-Metaboliten haben YAMADA et al. (1985) in vitro im Homogenat von Ratten- und Hühnereien einen tierartlich unterschiedlichen Abbauweg aufgezeigt.

2.2. Deuteriertes 1,25-(OH)₂-D₃ (26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol) als neuer synthetischer Vitamin D₃-Metabolit

Vor kurzem wurde mit dem 26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol ein deuterierter Vitamin D₃-Metabolit entwickelt. Der durch die deuterierten Seitenketten verzögerte Abbau und die daraus resultierende längere Halbwertszeit sollte eine niedrigere Dosierung bei gleicher Wirkung ermöglichen. Damit hoffte man, die toxischen Nebenwirkungen von 1,25-(OH)₂-D₃ und anderen D₃-Metaboliten zu mindern.

Der in vitro durchgeführte Vergleich der biologischen Wirksamkeit von 26,27-Hexadeutero-1,25-(OH)₂-D₃ und 1,25-(OH)₂-D₃ erbrachte, daß der deuterierte Vitamin D₃-Metabolit in der gleichen Dosierung wie 1,25-(OH)₂-D₃ eine um 8 % verminderte intestinale Calciumabsorption und eine um 36 % verminderte Calciummobilisation aus dem Knochen bei gleicher kompetitiver Bindungsaffinität zum 1,25-(OH)₂-D₃-Rezeptor hat (USKOKOVIC et al., 1988).

Das deuterierte 1,25-(OH)₂-D₃ ist, wie alle isotoopenmarkierten Verbindungen, chemisch mehr oder weniger identisch mit dem unmarkierten 1,25-(OH)₂-D₃. Ausnahmen von dieser Regel treten dann auf, wenn im Lauf der Metabolisierung die Bindung zum Isotop gelöst werden muß, und dies den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt. Dann treten sogenannte kinetische Isotopeneffekte auf, die die Verstoffwechselung des markierten Moleküls verlangsamen. Dadurch erhält das radioaktivmarkierte Molekül eine längere Halbwertszeit und hat damit eine längere Wirkungszeit bei gleicher Dosierung wie das unmarkierte Molekül.

2.3. Faktoren mit Auswirkung auf die Legeleistung und Eischalenqualität beim Legehuhn

Legeleistung und mit steigendem Grad der Technisierung der Legehennenhaltung mehr und mehr auch die Eischalenqualität sind für die Wirtschaftlichkeit der Legehennenbetriebe von entscheidender Bedeutung. Daher wird seit langem ein großer Teil der Forschung auf dem Geflügelsektor diesen beiden Merkmalen gewidmet. Aus der Literatur wurden hier nur die neuesten Quellen und Ergebnisse berücksichtigt.

2.3.1. Alimentäre Faktoren

Proteine, Lipide

Bei der Zusammensetzung der Futterr ration spielen besonders Proteine (ROLAND, 1980) und Lipide eine wichtige Rolle.

Ein niedriger Proteinanteil vermindert das absolute Gewicht der Eier nur gering, senkt jedoch die Legeleistung sehr stark (MORRIS and GOUS, 1988).

CHAH and MORGAN (1985) zeigen, daß eine Legehennen an Tagen mit Eibildung 19 g Protein, an Tagen ohne Eibildung dagegen nur 15 g Protein benötigt.

HOYLE and GARLICH (1987) stellen fest, daß ein zu hoher Fettanteil von 8 bis 9 % das absolute Gewicht des Eies erniedrigt, ohne die Legeleistung oder die Eischalenqualität signifikant zu beeinflussen.

Mineralstoffe, Elektrolyte

Abgesehen von völligen Grundfutterimbancen oder toxischen Zusatzstoffen ist die Mineralstoffversorgung der wohl wichtigste alimentäre Faktor für Legeleistung und Eischalenqualität. Hiervon sind besonders die hauptsächlich für die Eischalencalcifizierung benötigten Mengenelemente Calcium und Phosphor von Bedeutung.

Zahlreiche Literaturstellen geben ein Optimum von 3.0 - 3.5 % Calcium und 0.42 - 0.72 % Phosphor im Futter an (OUSTERHOUT, 1980; MILES et al., 1983; LIU et al., 1987).

Abweichungen davon führen zur Abnahme der Legeleistung und besonders bei Calciummangel auch zu einem starken Abfall der Eischalenqualität (ROLAND, 1986a; ROLAND and FARMER, 1986; JACKSON et al., 1987; AUSTIC and KESHAVERZ, 1988).

Dies ist auch durch ein geändertes Calcium-Phosphor-Verhältnis mit hohem Phosphor bei niedrigem Calciumgehalt nicht zu beeinflussen (HÄRTEL, 1988).

Dabei ist auch wichtig, in welcher Darreichungsform - ob als Austernschalen (HAMILTON et al., 1985) oder Limestone (ROLAND 1986b, MAKLED and CHARLES, 1987), ob in großer oder kleiner Partikelgröße (PROUDFOOT and HULAN, 1987) - und zu welcher Tageszeit (SCHOLTYSEK, 1986) eine eventuelle Calciumzufütterung erfolgt (FARMER et al., 1986).

Von den anderen Mineralien und Spurenelementen sind vor allem Natrium, Mangan (KARUNAJEEWA and THAM, 1987), Magnesium (ÖZPINAR, 1987) und Chlorid (AUSTIC and KESHAVERZ, 1988) von Bedeutung.

Natrium wird eingesetzt als NaHCO_3 (MAKLED and CHARLES, 1987) und als NaCl (ROUSH and MILET, 1986). Dabei ist grundsätzlich ein steigender Natriumgehalt, bis hin zu einer kritischen Grenze förderlich. Diese Schwelle liegt für NaCl im Trinkwasser bei 600 mg/l (BALNAVE and YOSELEWITZ, 1987), darunter wird ein rapides Absinken der Eischalenqualität beobachtet.

AUSTIC (1984) beschreibt die Wirkung eines zu hohen Chloridanteils und dessen stark senkenden Einfluß auf die Eischalenqualität.

Ebenso senkt ein zu hoher Sulfatanteil in der Futterration die Legeleistung und die Eischalenqualität (LIU et al., 1987).

Die Zufuhr von Elektrolyten beeinflusst die Säure-Basen-Regulation im Blut und regelt damit auch die Eibildung mit (AUSTIC and KESHAVARZ, 1988; HUGHES, 1988).

Toxische Schwermetalle senken sowohl die Legeleistung als auch die Eischalenqualität (VOGT et al., 1986).

Energiegehalt

KOVAC and ANGELOVICOVA (1986) zeigen, daß Eier die höchsten Eigewichte und die höchsten Eischalengewichte bei einem Energiegehalt des Futters von 11.93 MJ/kg erreichen.

Luzernesaft

KHAI TOV et al. (1986) beschreiben, daß Luzernesaft (10 ml / Legehennen) mit 3 % Protein- und 1 % Fettgehalt und 300 µg/kg eine Verbesserung der Legeleistung um 11 % und der Eischalenqualität um 6 % bewirkt.

2.3.2. Genetische Faktoren

Generell unterscheiden sich leistungsmäßig vor allem die unterschiedlichen Rassetypen und innerhalb des Legetyps auch noch die einzelnen Zuchtlinien. MORRIS (1985) beschreibt den genetischen Einfluß vor allem für die Merkmale "Eischalendicke" und "absolutes Eigewicht". POTTS et al. (1985) bezeichnen hauptsächlich die Eischalendicke als genetisch beeinflußt. LENNARD et al. (1981) finden Unterschiede im Brucheieranteil und im Windeieranteil bei verschiedenen genetischen Linien von Legehennen.

2.3.3. Umwelt- und Managementfaktoren

HUGHES et al. (1986) stellen die Legehennen als Leistungstyp dar, der besonders empfindlich auf verschiedenste Streßfaktoren ist und auf diese mit einem Nachlassen der Legeleistung und der Eischalenqualität reagiert.

Futtermangement

KONDO et al. (1985) beschreiben in einem groß angelegten Legehennenversuch durch ein Erhöhen der Fütterungshäufigkeit auf dreimalig pro Tag eine Steigerung der Legeleistung.

Ebenso wird durch das, aufgrund des hohen maschinellen und zeitlichen Aufwandes, wohl nicht praxisrelevante "Cafeteria Feeding" eine deutliche Besserung der Legeleistung und der Eischalenqualität nachgewiesen (CHAH and MORAN, 1985; MORAN, 1986). Dieses "Cafeteria Feeding" besteht aus einem Anbieten verschieden zusammengesetzter Futterrationen (meist eine Energieration, eine Proteinration und eine Calciumration) für jede Henne zur freien Auswahl. Als Folgerung daraus wird versucht, das Futter fraktioniert auf eine "Legeration" (vormittags zur Eiablage, hoher Energiegehalt) und eine "Schalenration" (nachmittags zur Eibildung und Calcifizierung, hoher Protein- und Calciumgehalt) zu verabreichen. SCHOLTYSEK (1986) erzeugt damit eine Steigerung der Legeleistung und der Eischalenqualität.

Tränkemethoden

ROUSH and MYLET (1986) testen die verschiedenen Tränkesysteme und verzeichnen eine leichte Leistungsminderung bei Nippeltränken, während alle anderen Systeme gleichwertig sind.

Lichtprogramm

Das Lichtprogramm ist einer der wichtigsten und meist-modifizierten Umweltfaktoren, da sich der biologische Rhythmus der Legehenne an der Tageslichtlänge orientiert.

SHANAWANY (1982) vergleicht 20 verschiedene Lichtprogramme und bezeichnet einen 27-bis 28-Stunden-Takt des Lichtprogrammes als optimal. Er beschreibt dabei eine Verbesserung der Eischalenqualität um 6-10 % und stellt fest, daß pro Lichttakt maximal ein Ei gelegt wird.

ANDREWS et al. (1987) zeigen beim Wechsel von 8 Lichtstunden- / 16 Dunkelstunden-Takt zum 16 Lichtstunden- / 8 Dunkelstunden-Takt eine Abnahme der Legeleistung um 4 % und damit den negativen Einfluß eines längeren Lichtintervalls.

MORRIS et al. (1988), die das "Cornell intermittent lighting program" (2 Licht- / 4 Dunkel- / 8 Licht- / 10 Dunkelstunden pro Tag) untersuchen, verzeichnen, daß dieses gegenüber einem normalen 16 Lichtstunden- / 8 Dunkelstunden-Lichtprogramm eine leicht bessere Legeleistung bei weniger Futterverbrauch bewirkt.

MIDGLEY et al. (1988), die das noch kompliziertere "BIO-mittent lighting system" (15 Stunden lang ein Wechsel von 15 min Licht und 45 min Dunkel, dann 15 min Licht, dann 30 min Dunkel, dann 15 min Licht, dann 8 Stunden Dunkel) gegenüber konventionellen 16 Lichtstunden / 8 Dunkelstunden- und 8 Lichtstunden / 16 Dunkelstunden-Lichtprogrammen testen, dokumentieren eine deutlich geringere Mortalität, einen geringeren Futterverzehr, weniger Stresshormonausschüttung und eine etwas bessere Legeleistung und Eischalenqualität.

Temperatur

MANNER (1982) zeigt bei Umgebungstemperaturen über 24 °C eine deutliche Legeleistungsdepression, die nicht allein durch die abnehmende Futteraufnahme erklärt werden kann.

EMERY et al. (1984) geben als Optimaltemperatur für Legehennenhaltung 23.9 °C an und stellen fest, daß Hitzestress vor allem die Eischalenqualität mindert.

Käfigbesatzdichte, Stress

ROLAND (1978) betont in seiner Serie von Artikeln zu den Ursachen von Brucheiern unter anderem als wichtigen Faktor die Besatzdichte (Tiere/Käfig). Diese soll so gering wie wirtschaftlich nur irgend vertretbar gehalten werden, da sie großen Einfluß auf die Beschädigung von Eiern durch die Tiere selbst hat. Aus dem durch zu engen Lebensraum erzeugten Individualstress der Legehenne resultiert auch eine geringere Legeleistung.

Zur Vermeidung von Legeleistungsrückgang und Absinken der Eischalenqualität dürfen die Legehennen besonders nachmittags während der Eibildung und Eicalcifizierung nicht gestört werden (ROLAND, 1984). Jedwede Manipulation im Stall muß vermieden werden. Sowohl akustische, optische und thermische Stressoren als auch schlechte Haltungsbedingungen wirken legeleistungsdepressiv und mindern besonders stark die Eischalenqualität.

2.3.4. Mauser

Im Alter von 14-22 Monaten, also im 8.-16. Legemonat, erfolgt bei allen Legehennen ein physiologischer, mehr oder weniger starker Abfall der Legeleistung und der Eischalenqualität. In den meisten Betrieben werden die Legehennen dann entweder geschlachtet oder zwangsgemausert. Dazu gibt es verschiedene Systeme, die alle auf Futterentzug, Tränkeentzug, Drosseln des Lichtprogramms, Ausreißen der Flügelschwingen oder medikamenteller - teils toxischer (Zink) - Zufütterung basieren. Während der Mauser sistiert die Eiablage völlig und der Stoffwechsel der Legehennen hat Zeit sich zu regenerieren.

Nach der Mauser haben die Tiere wieder eine hohe Legeleistung, vergleichbar mit der 1. Legeperiode (HAMILTON and THOMPSON, 1984; MORRIS, 1985), und eine gute Eischalenqualität, die meist besser als in der 1. Legeperiode ist (ABE et al., 1982).

2.3.5. Infektionskrankheiten

Alle klinisch manifesten Infektionskrankheiten verringern die Legeleistung und erzeugen eine Verschlechterung der Eischalenqualität.

Besonders große Schäden richtete eine als "egg drop syndrom 76" beschriebene, 1976 in Irland aufgetretene Adenovirusinfektion an.

2.3.6. Vitamin D-Versorgung und Vitamin D-Metaboliten als Futterzusatzstoffe

Vitamin D-Versorgung

Bei der Legehennen, die aufgrund des Kunstlichtes nur wenig oder kein Vitamin D selbst synthetisieren kann, muß Vitamin D dem Futter zugesetzt werden.

LIU et al. (1987) geben einen Vitamin D-Bedarf der Legehennen von mindestens 500 IE / kg Futter an.

GOODSON-WILLIAMS et al. (1986) zeigen in einem groß angelegten Legehennenversuch ($n = 450$), daß sich die Legeleistung zur Vitamin D_3 -Dosierung in einer quadratischen Beziehung verhält. Bei einer Dosis zwischen 275 IE und 44 000 IE D_3 / kg Futter ändert sich allerdings die Legeleistung nur minimal. Ganz niedrige Dosen drosseln die Eiablage sehr stark bis gegen Null. Sehr hohe Dosierungen (88 000 IE D_3 / kg Futter) bewirken im Vergleich zur Kontrolle mit 2 200 IE / kg Futter eine Legeleistungsdepression von 10 %.

AMEENUDDIN et al. (1986) hingegen beobachten bei 200 000 IE D_3 / kg Futter nach 28 Tagen noch keinen senkenden Effekt auf die Legeleistung, aber eine deutliche Reduzierung der Eischalenqualität im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 960 IE D_3 / kg Futter.

SHEN et al. (1981) ziehen aus einem Legehennenversuch, in dem Vitamin D₃ in verschiedenen Dosierungen eingesetzt wurde, den Schluß, daß bei niedriger Vitamin D₃-Dosierung von 125 IE oder 250 IE / kg Futter die Eischalenqualität ein viel sensitiverer Indikator als die Legeleistung ist. Diese ändert sich erst dann deutlich, wenn überhaupt kein Vitamin D₃ mehr angeboten wird.

SHEN et al. (1982) führen einen Legehennenversuch völlig ohne Vitamin D₃-Zusatz durch und beweisen, daß Legehennen erst nach circa 4 Wochen einen dann aber rapiden Einbruch in der Legeleistung auf etwa 50 % der Ausgangslegeleistung haben. Der Anteil an Bruch- und Windeiern dagegen steigt schon nach 2-3 Wochen um das Doppelte bis Dreifache. Ältere Legehennen reagieren nicht so empfindlich auf Vitamin D-Mangel.

In den Legehennenbetrieben werden üblicherweise 2 000 IE - 2 800 IE Vitamin D₃ zum Legehennenalleinfutter zugesetzt, um sicher eine ausreichende Versorgung zu garantieren.

Vitamin D₃-Metaboliten als Futterzusatzstoff

Dem Futter können auch anstatt Vitamin D₃ synthetische Vitamin D₃-Metaboliten zugesetzt werden. Dabei finden vor allem die intermediären Vorstufen 1- α -(OH)-D₃ und 25-(OH)-D₃ sowie die aktive Form des Vitamin D₃ 1,25-(OH)₂-D₃ Verwendung.

COHEN et al. (1978) zeigen bei 1- α -(OH)-D₃ Futterzusatz, sowohl allein als auch in Kombination mit Vitamin D₃, in einer hohen Dosis von 15 μ g / kg Futter eine Reduzierung der Legeleistung und des Eigewichtes gegenüber Vitamin D₃ und 25-(OH)-D₃.

ABDULRAHIM et al. (1979) setzen $1,25-(OH)_2-D_3$, $1\text{-}\alpha\text{-(OH)-}D_3$ und $25-(OH)-D_3$ in unterschiedlichen Dosierungen (3 bzw 9 μg / kg Futter) ein und stellen, außer einer Abnahme der Legeleistung bei hoher Dosierung von $1\text{-}\alpha\text{-(OH)-}D_3$ und $1,25-(OH)_2-D_3$, dabei keine Veränderungen fest.

SOARES et al. (1982) zeigen ebenfalls für $1\text{-}\alpha\text{-(OH)-}D_3$ einen sogenannten "toxischen Effekt" bei hoher Dosierung (über 6.8 μg / kg Futter), der sich in einem Rückgang von Legeleistung und Eischalenqualität äußert. $25-(OH)-D_3$ weist diesen toxischen Effekt auch bei hoher Dosierung nicht auf.

Bei einer elektronenmikroskopischen Eischalenuntersuchung finden NARBAITZ et al. (1987) keine Unterschiede zwischen $1,25-(OH)_2-D_3$ supplementierten und mit Vitamin D_3 gefütterten Legehennen.

Eine kanadische Untersuchung (N.N., 1987) zeigt bei $1,25-(OH)_2-D_3$ -Zusatz anstatt Vitamin D_3 eine signifikante Zunahme der Legeleistung und der Eischalenqualität.

AMEENUDDIN et al. (1987) können dies bei $1,25-(OH)_2-D_3$ -Futterzusätzen zwischen 0.5 und 3.0 μg / kg gegenüber 12 μg Vitamin D_3 / kg nicht bestätigen. Sie finden zwar eine dosisabhängig steigende $1,25-(OH)_2-D_3$ -Wirkung auf die Legeleistung. Diese liegt aber selbst bei 3.0 μg $1,25-(OH)_2-D_3$ / kg um 12 % niedriger als die Legeleistung bei optimaler Vitamin D_3 -Versorgung.

3. WACHTELVERSUCH

3.1. Tiermaterial und Haltungsform

Im Versuch wurden 240 Legewachteln (*Coturnix coturnix japonica*) aus der institutseigenen Wachtelzucht eingesetzt und in Institutsstallungen aufgezogen.

Die Tiere wurden in Gruppenhaltung zu je 3 Tieren in 80 Käfigen aus Nirosta-Stahl in einem Raum mit einer Größe von 0.018 Kubikmeter (30 cm * 30 cm * 20 cm) gehalten. Auf einer Höhe von 60 cm, 90 cm, 120 cm und 150 cm waren je 10 Käfige am Käfigdach eingehängt. Damit trug ein Nirosta-Trägergestell 40 Käfige. Zwei solcher Trägergestelle standen frei in einem circa 17 m² großen Raum bei einer Temperatur von konstant 20 °C (± 1 °C). Der Raum war abgedunkelt und wurde mit durchschnittlich 19.7 Lux 24 Stunden pro Tag durch 4 Kryptonleuchtstoffröhren beleuchtet. Frischluftzufuhr erfolgte durch Zwangsbelüftung. Wasser konnte von den Tieren ad libitum aufgenommen werden. An der Käfigvorderseite erfolgte die Fütterung in 30 cm langen Futtertrögen ebenfalls ad libitum. Auf dem abgeschrägten Käfigboden konnten die Eier ohne Verschmutzung und Beschädigung nach vorne abrollen. Die Identität der Tiere wurde durch Flügelmarken gesichert.

3.2. Versuchsfutter

Die Tiere wurden je nach Versuchsperiode unterschiedlich gefüttert.

In einer Futterperiode zur Herstellung gleicher Ausgangsvoraussetzungen für alle Tiere wurde handelsübliches Zuchtwachtelfutter der Fa. Feldmochinger Kraftfutterwerke, München mit folgender Zusammensetzung verabreicht:

Tab. 1 ZUCHTWACHTELFUTTER

Futterzusammensetzung

Sojaextraktionsschrot (dampferhitzt), Mais, Calciumcarbonat, Fischmehl, Luzernegrasgrünmehl, Vormischung, Blutmehl, Tierfett, Eiweißkonzentrat für Ferkel, Methionin

Inhaltsstoffe [%]

Rohprotein	27.0
Rohasche	12.0
Rohfaser	5.0
Rohfett	4.0
Calcium	2.8
Phosphor	0.7
Natrium	0.15
Methionin	0.7

Zusatzstoffe / kg Futter

Vitamin A	2.4 mg
Vitamin D ₃	75.0 µg
Vitamin E	30.0 mg
Kupfer	30.0 mg

In der Depletionsperiode wurde eine Vitamin D-armes Wachtelfutter (modifiziert nach ZUCKER und GROPP, 1968) mit folgender Zusammensetzung gefüttert:

Tab. 2 VITAMIN D-ARMES WACHTELFUTTER

Futterzusammensetzung [%]	
Mais	48.0
Sojaextraktionsschrot, dampferhitzt	36.1
Rindertalg	5.0
Molkenpulver, teilentzuckert	1.0
Calciumcarbonat (CaCO_3)	6.0
Calciumphosphat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	2.5
Kochsalz (NaCl)	0.4
Vitamin- und Spurenelementvormischung	1.0
	100.0

Vitamin- und Spurenelementvormischung enthält in 10 g (entsprechend 1 kg Futter):

Retinol	1.50 mg	Ca-Panthotenat	15.00 mg
DL-Tocopherolacetat	20.00 mg	Nikotinsäure	25.00 mg
Vitamin K 3	1.00 mg	Mangan (Sulfat)	65.00 mg
Riboflavin	4.00 mg	Zink (Carbonat)	52.00 mg
Cyanocobalamin	0.02 mg	DL-Methionin	1800.00 mg

auf 10 g Sojafeinmehl

Während der Versuchsperiode erhielten die Tiere ein Versuchsfutter, das dem Vitamin D-armen Wachtelfutter in der Zusammensetzung entsprach und lediglich mit Vitamin D-Metaboliten angereichert wurde. Die Metaboliten wurden in einem Äthanol-Propandiol-Gemisch (1 + 9) gelöst, dann in einen kleinen Teil der mit Diethylether befeuchteten Sojafraktion eingerührt und über dem Wasserbad getrocknet. Anschließend wurde das Metabolitensojagemisch stufenweise in die Futterrationsration eingemischt.

3.3. Methodik des Wachteleischalentests

Im Wachteleischalentest wird das Trockeneischalengewicht als Maß für die Calciumausscheidung pro Zeiteinheit und Tier, und damit als Maß für die biologische Aktivität der getesteten Vitamin D-Metaboliten im Vergleich zu einem Vitamin D-Standard betrachtet (ZUCKER und RAMBECK, 1981; KOPP, 1985; RAMBECK et al, 1985).

Täglich um die gleiche Zeit (8.00 Uhr) wurden die Eier getrennt nach Käfigen gesammelt. Anschließend wurden sie von Pol zu Pol mit einer Schere aufgeschnitten, um Eiklar und Eidotter aus der Schale zu entfernen, mit destilliertem Wasser ausgespült und dann käfigweise getrennt auf Petrischalen 24 Stunden bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden die Eischalen mittels einer Analysenwaage (Mettler AE 160) auf 0.001 g genau gewogen.

Daraus wurde über 20 Versuchstage die Trockeneischalengewichtsausscheidung pro Tier und Tag berechnet und der Mittelwert einer Versuchsgruppe gebildet.

3.4. Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden bei Versuchsbeginn im Alter von exakt 4 Monaten zu je 3 Tieren auf die 80 Käfige verteilt und mittels Flügelmarken markiert. Um für alle Tiere gleiche Rahmenbedingungen zu schaffen, wurden die Legewachteln 3 Wochen lang mit industriellem Zucht-wachtelfutter gefüttert.

Dann wurden die Tiere in die Depletionsphase genommen.

Nach ZUCKER und GROPP (1968) hat die Wachtelhenne nur eine geringe Vitamin D₃-Speicherfähigkeit.

BAUMEISTER (1973) empfiehlt eine Depletionszeit von 2-3 Wochen unter Kontrolle des Trockeneischalengewichts, das am Ende der Depletion über eine Dauer von mindestens 3 Tagen unter 40 mg / Tier und Tag liegen sollte. In vorliegendem Versuch dauerte die Depletionszeit 23 Tage und das Trockeneischalengewicht lag am Ende bei 30 mg / Tier und Tag.

Vor Beginn der Versuchsperiode wurde die Lichtverteilung im Stall gemessen und die Käfige dann balanciert nach Luxstärke und nach dem Trockeneischalengewicht der letzten 6 Tage der Depletion in 12 Gruppen gleicher Stärke (je 6 Käfige a 3 Wachteln) eingeteilt.

Ab dem Tag der Futterumstellung auf Versuchsfutter mit Vitamin D₃-Metabolitenzusatz wurde bis zum 22. Tag das Trockeneischalengewicht täglich käfigweise bestimmt.

In dieser Phase der Vitamin D- bzw Metaboliten-zufütterung stehen die Trockeneischalengewichte in einer direkten linearen Beziehung zur Dosierung, so daß ein Vergleich der biologischen Wirksamkeit der Metaboliten zu einem Vitamin D-Standard möglich ist.

Dies trifft vor allem im Bereich einer suboptimalen Vitamin D-Versorgung von 20 - 70 % zu (GROPP und ZUCKER, 1969; GROPP und ZUCKER, 1971).

Die Mortalität während der Versuchsperiode betrug 9.6 % (21 Tiere), was vor allem eine Folge der Haltungsbedingungen war.

3.5. Versuchsergebnisse

Über eine Versuchsperiode von 20 Tagen wurden folgende Trockeneischalengewichte gemessen:

Tab. 3 TROCKENEISCHALENGEWICHT (=TEG)

WACHTELVERSUCH

n = 6

Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$ [mg TEG/Tier und Tag]	$\pm S\bar{X}$
2.0 $\mu\text{g D}_3$	106.2	16.4
3.5 $\mu\text{g D}_3$	190.0	10.7
5.0 $\mu\text{g D}_3$	342.8	62.1
0.27 $\mu\text{g 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	86.8	8.3
0.54 $\mu\text{g 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	159.4	26.9
0.81 $\mu\text{g 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	235.9	27.0
0.27 $\mu\text{g deut. 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	118.7	18.4
0.54 $\mu\text{g deut. 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	151.1	20.1
0.81 $\mu\text{g deut. 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	187.4	12.5
10.82 $\mu\text{g 24,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	79.2	17.5
10.82 $\mu\text{g 24,25-(OH)}_2\text{-D}_3$ + 100 mg Vit.C	86.1	10.9
0.54 $\mu\text{g 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$	159.4	26.9
0.54 $\mu\text{g 1,25-(OH)}_2\text{-D}_3$ + 100 mg Vit.C	95.5	26.4

Für die Prüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurden für die $1,25-(OH)_2-D_3$ -Gruppe zur Vitamin D_3 -Gruppe, die $26,27$ -Hexadeutero- $1,25-(OH)_2-D_3$ -Gruppe zur Vitamin D_3 -Gruppe und auch für die nicht deuterierte Gruppe zur deuterierten Gruppe Varianzanalysen erstellt, die auf dem F-Test (nach BRONSTEIN and SEMENDJAJEW, 1987) basieren.

Die Varianzanalyse $1,25-(OH)_2-D_3$ -Gruppe zu Vitamin D_3 -Gruppe ist bei $p \leq 0.05$ zulässig, die anderen beiden Varianzanalysen jedoch nicht, da es sich, aufgrund der starken Unterschiede der Steigungen der dosisabhängigen Wirkungsgeraden zueinander, um keine vergleichbaren Ergebnisse handelt.

Die Wirkungsgeraden innerhalb einer Metabolitengruppe sind bei allen 3 Versuchsreihen zulässig ($p \leq 0.01$).

Das heißt, daß die Versuchsreihen in sich eine statistisch zulässige Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweisen.

Damit kann statistisch abgesichert festgestellt werden, daß $1,25-(OH)_2-D_3$ in den eingesetzten Dosierungen eine geringere biologische Wirkung als Vitamin D_3 hat und deuteriertes $1,25-(OH)_2-D_3$ keine dosisabhängig-ähnliche Wirkung wie Vitamin D_3 und $1,25-(OH)_2-D_3$ hat.

Für die Vitamin C-Zusatzversuche wurde zur Prüfung der statistischen Signifikanz ein T-Test (nach BRONSTEIN and SEMENDJAJEW, 1987) durchgeführt.

Dabei ergaben sich bei $p \leq 0.05$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Lediglich die $1,25-(OH)_2-D_3$ -Gruppen mit und ohne Vitamin C ergeben bei $p \leq 0.1$ eine signifikante Verschlechterung mit Vitamin C-Zusatz.

4. HÜHNERVERSUCH

4.1. Tiermaterial und Haltungsform

Im Versuch wurden 55 Legehennen der "Braunen Legerasse" (*Gallus gallus domesticus*, Brown Leghorn) aus einem Legehennenbetrieb mittlerer Größe eingesetzt, die im Alter von 16 Monaten am Ende ihrer Legeperiode angelangt waren und damit eine zurückgehende Legeleistung und abnehmende Eischalenqualität zeigten.

Die Tiere wurden während der ganzen Versuchsperiode in Einzelkäfighaltung in 0.096 Kubikmeter (60 cm * 40 cm * 40 cm) großen nichtrostenden Metallkäfigen gehalten. Jeweils 14 Käfige befanden sich in 2 Reihen nebeneinander und auf 80 cm und 140 cm Höhe in 2 Ebenen übereinander.

Der Raum mit circa 24 m² wurde auf konstant 16 °C (± 2 °C) beheizt.

Der abgedunkelte Raum erhielt ein vom Legebetrieb übernommenes Lichtprogramm mit einem 8-Stunden-Dunkeltakt von 15.00 Uhr bis 23.00 Uhr und einem 16-Stunden-Lichttakt von 23.00 Uhr bis 15.00 Uhr. Im Lichttakt wurde der Raum mit Hilfe von 8 Neonleuchtstoffröhren bei durchschnittlich 22.1 Lux beleuchtet. Frischluftzufuhr erfolgte durch eine Absauganlage mittels Unterdruckbelüftung. Die Wasseraufnahme der Tiere wurde durch Nippeltränken ad libitum ermöglicht. Die Futteraufnahme erfolgte aus circa 65 cm langen Futtertrögen an der Stirnseite der Käfige ebenfalls ad libitum. Durch den leicht geneigten Käfigboden konnten die Eier ohne Beschädigung und Verschmutzung nach vorne abrollen.

Die Identität der Tiere wurde durch Flügelmarken gesichert.

4.2. Versuchsfutter

Die Tiere erhielten nach dem Transport aus dem Legebetrieb zuerst 3 Tage ein betriebseigenes Futter des Ursprungsbetriebes. Damit wurde der Umstellungsstreß vermindert, und ein Mausern der Tiere verhindert. Dieses Futter hatte folgende Zusammensetzung:

Tab. 4 **LEGEHENNENFUTTER**

HERSTELLER: Baywa Kraftfutter, Werk Regensburg
Raiffeisen Kraftfutterwerke GmbH München
FUTTERTYP: Alleinfutter 1 für Legehennen
Alleinmehl LP 2 000

Rationszusammensetzung

Mais, Sojaextraktionsschrot(dampferhitzt), Calciumcarbonat, Sonnenblumenextraktionsschrot, Tiermehl, Weizen-grießkleie, Ackerbohnen, Erbsen, Pflanzenöl, Luzerne-grünmehl, Mineral- und Zusatzstoffmischung

Inhaltsstoffe [%]

Rohprotein	18.00	Calcium	3.60
Rohasche	12.50	Phosphor	0.60
Rohfett	6.00	Natrium	0.16
Rohfaser	5.50	Methionin	0.37

Zusatzstoffe / kg Futter

Vitamin A	2.4 mg	Propionsäure	
Vitamin D ₃	50.0 µg	Antioxidans BHT	
Vitamin E	30.0 mg		

Danach wurden die Legehennen auf ein selbstgemischtes, bedarfsgerechtes Legehennenfutter mit 2 000 IE Vitamin D₃ / kg Futter umgestellt.

Dieses Futter hatte exakt dieselbe Zusammensetzung wie das Versuchsfutter, nur daß dem Versuchsfutter in die Sojafraktion die Metaboliten eingemischt wurden. Die Metaboliten wurden dazu in einem Äthanol-Propandiol-Gemisch (1 + 9) gelöst und in einen Teil der mit Diäthyläther befeuchteten Sojafraktion eingerührt und dann stufenweise in die Versuchsfutterverdünnung gemischt.

Tab. 5 **VERSUCHSFUTTER LEGEHENNENVERSUCH**

Rationszusammensetzung [%]

Mais	56.20
Sojaextraktionsschrot, feingemahlen	28.00
Haferhartschalengrieß	5.00
Sojaöl	2.00
Calciumcarbonat (CaCO ₃)	5.80
Calciumphosphat (CaHPO ₄ * 2 H ₂ O)	1.75
Kochsalz (NaCl)	0.25
Vitamin- und Spurenelementvormischung	1.00

Vitamin- und Spurenelementvormischung enthält in 10 g (entsprechend 1 kg Futter):

Retinol	1.50 mg	Ca-Panthotenat	15.00 mg
DL-Tocopherolacetat	20.00 mg	Nikotinsäure	25.00 mg
Vitamin K 3	1.00 mg	Mangan (Sulfat)	65.00 mg
Riboflavin	4.00 mg	Zink (Carbonat)	52.00 mg
Cyanocobalamin	0.02 mg	DL-Methionin	1800.00 mg
auf 10 g Sojafeinmehl			

4.3. Bestimmung der Legeparameter

Um ein exaktes 24-Stunden-Intervall zu erreichen, wurden die Eier die gesamte Versuchsperiode über jeweils um 8.00 Uhr morgens gesammelt. So konnte aufgrund der Einzelkäfighaltung jedes Ei exakt dem Tag und der Legehennen zugeordnet und dann anschließend sofort protokolliert werden.

Die Parameter ergaben sich wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{LEGELEISTUNG [LL]} &= \frac{\text{Summe der Eier}}{\text{Anzahl der Tage}} \\ \text{BRUCHEIERANTEIL [BEA]} &= \frac{\text{Summe der Brucheier}}{\text{Summe der Eier}} \\ \text{WINDEIERANTEIL [WEA]} &= \frac{\text{Summe der Windeier}}{\text{Summe der Eier}} \end{aligned}$$

4.4. Bestimmung der Eiparameter

Bestimmung des Parameters "EIGEWICHT"

Dazu wurden die Eier jeden Tag mit einer Analysenwaage (Mettler AE 160) auf 0.001 g genau gewogen.

Bestimmung des Parameters "SPEZIFISCHES GEWICHT DES EIES"

Zuerst wurde das Volumen des Eies ermittelt, indem das Ei an einem stabilen Ständer in einem Drahtnetz hängend in ein auf einer Analysenwaage (Mettler AE 160) stehendes Wassergefäß mit destilliertem Wasser getaucht wurde. Dabei wurde die Gewichtszunahme gegenüber dem Blindwert von Wassermenge mit Drahtnetz ohne Ei gemessen und, da es sich um destilliertes Wasser handelte, dem verdrängten Volumen gleichgesetzt. Hierbei wurde eine Wasser- und Raumtemperatur von 20 °C (± 4 °C) eingehalten (HAMILTON, 1982, modifiziert von HEMPE et al., 1988).

Anschließend wurde das spezifische Gewicht des Eies wie folgt berechnet:

$$\text{SPEZIFISCHES GEWICHT DES EIES [g/ml]} = \frac{\text{Eigewicht}}{\text{Eivolumen}}$$

Bestimmung des Parameters "BRUCHFESTIGKEIT" (= BF)

Hierbei wurden die Eier in ein Bruchfestigkeitsmeßgerät (Feinmeßzeug Fabrik Sahl, Schweiz) eingespannt, dann kontinuierlich steigend belastet und die beim Bruch angezeigte Kraft in Newton [N] abgelesen.

THOMPSON and HAMILTON (1986) zeigen, daß diese Methodik in etwa vergleichbar mit der kommerziellen Behandlung von Legehenneneiern ist. Damit ist sie als Maßstab für die entstehenden wirtschaftlichen Schäden durch die abnehmende Schalenqualität am Ende der Legeperiode gut geeignet.

Bestimmung des Parameters "EISCHALENDICKE" (= ESD)

Die Messung wurde mit einem Punktfühler, der über eine Mikrometerschraube auf eine Skala graduert wurde, punktuell am Äquator des Eies erhoben. Um die durch den Feuchtigkeitsgehalt der Schale bedingten Schwankungen auszuschließen, wurde die Eischale erst nach 24 Stunden Trocknen bei 105 °C und anschließend Abkühlen im Exsikkator gemessen.

Bestimmung des Parameters "TROCKENEISCHALENGEWICHT" (= TEG)

Das Ei wurde mit einer Schere aufgeschnitten. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser Eiklar und Eidotter aus der Schale herausgespült. Die so gereinigten Eischalen wurden auf Petrischalen bei 105 °C im Trockenschrank 24 Stunden getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Dann wurden die Eischalen auf einer Analysenwaage (Mettler AE 160) auf 0.001 g genau gewogen.

Bestimmung des Parameters "PROZENTUALES EISCHALENGEWICHT"

Dies ist ein rein rechnerischer Parameter, der nach KLINGENSMITH und HESTER (1985) eine gute Aussage über die Eischalenqualität liefert:

$$\text{PROZ. EISCHALENGEWICHT [\%]} = \frac{\text{TEG} * 100 \text{ [g]}}{\text{Eigewicht [g]}}$$

Bestimmung des Parameters "EIOBERFLÄCHE" (= EO)

Dies ist ebenfalls ein rechnerischer Parameter nach MUELLER und SCOTT (1940), den MORRIS et al. (1977) und RAHN et al. (1981) als wichtigen Eiparameter bezeichnen:

$$\text{EIOBERFLÄCHE [cm]} = 4.67 * \text{Eigewicht}^{2/3}$$

4.5. Bestimmung des Körpergewichts

Die Hühner wurden am Tag der Schlachtung gewogen und das Körpergewicht auf ± 50 g genau ermittelt.

4.6. Bestimmung der relativen Knochenasche

Für die Knochenaschebestimmung wurde am Versuchsende der rechte Ständer vom frisch getöteten Tier abgesetzt und bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Phalanx media und die Phalanx distalis der rechten Mittelzehe abgetrennt und eine Stunde gekocht. Dadurch konnten die zwei Knochen aus dem sie umgebenden Weichteilgewebe herauspräpariert werden. Die Knochen wurden gewogen und 48 Stunden lang bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator das Trockengewicht bestimmt.

Anschließend wurden die Proben 48 Stunden bei 650 °C im Muffelofen verascht. Nach erneutem Abkühlen im Exsikator wurde das Knochenaschegewicht auf einer Analysenwaage ermittelt.

Dieses Knochenaschegewicht wurde auf das jeweilige Knochengewicht bezogen und ergab den prozentualen Anteil der Knochenasche am Knochengewicht oder den relativen Knochenaschegehalt.

4.7. Bestimmung der Blutparameter

Die Blutprobenentnahme erfolgte am Tag der Tötung der Tiere durch Eröffnen der Vena jugularis dextra durch einen Skalpellschnitt und Auffangen des Blutes in Serumröhrchen mit gerinnungsförderndem Granulat. Diese wurden dann 2 Stunden zur Gerinnung stehen gelassen, anschließend bei 3 000 g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurden die einzelnen Blutparameteruntersuchungen wie folgt durchgeführt:

Serum-Calcium

Die Einzelseren wurden mit 5%-iger Lithiumchloridlösung (Verdünnungslösung nach HERMANN, Merck 9975) im Verhältnis 1 : 21 mit einem Dual-Diluter verdünnt. Die Messung wurde mit einem Eppendorf-Flammenphotometer (ELEX 6361) durchgeführt.

Serum-Phosphat

Die Serumphosphatbestimmung wurde mit dem Testkit "Phosphor" (Fa. Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Durch Zugabe von Trichloressigsäure zum Serum wurden Phosphatide und Serumproteine ausgefällt und nach Zentrifugation verworfen. Das anorganische Phosphat im Überstand bildet in saurer Lösung mit Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat einen gelbgefärbten Komplex. Dessen Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm spektralphotometrisch gegen den Blindwert bestimmt und mittels eines Standards auf die Serumphosphatkonzentration bezogen.

Serum-Alkalische Phosphatase

Die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase erfolgte gruppenweise gepoolt unter Verwendung des Testkits der Fa. Sigma Diagnostics.

Zum Serum gegebenes p-Nitrophenylphosphat wird durch die Alkalische Phosphatase zu anorganischem Phosphat und p-Nitrophenol hydrolysiert. Die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge an gelbgefärbtem p-Nitrophenol ist ein Maß für die Alkalische Phosphataseaktivität im Serum; die Zunahme der Absorption wird spektralphotometrisch bei 405 nm Wellenlänge gemessen und auf die Alkalische Phosphatase rückbezogen.

4.8. Bestimmung des CaBP

Sofort nach dem Töten der Tiere wurde ein circa 10 cm langes Stück Duodenum entnommen, der Darminhalt ausgestreift und mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Daraus wurde dann im Institutslabor ein Schleimhauthomogenat hergestellt (CORRADINO and WASSERMAN, 1971), indem der Darm am Gekröseansatz eröffnet, nochmals gespült, und anschließend mittels eines Objektträgers die Mucosa vorsichtig abgeschabt wurde. Diese wurde dann gewogen, mit einer 6-fachen Menge eiskalter Trispufferlösung (0.2 molar, pH 7.4) versetzt und mit einem Potter homogenisiert. Dann wurde 20 min bei 38 000 g und 3 °C zentrifugiert, der Überstand 12 min bei 60 °C zur Fällung der hitzelabilen Proteine inkubiert und nochmals 10 min bei 1 200 g zentrifugiert.

Im Überstand befindet sich nur noch das CaBP und andere hitzestabile Proteine (TAYLOR and WASSERMAN, 1967); dieser wurde bis zur Aufarbeitung bei - 20 °C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen wurde das als Bezug dienende Gesamtprotein mit der Methode nach LOWRY et al. (1951) bestimmt.

Die modifizierte Methode zur Bestimmung der CaBP-Aktivität nach WASSERMAN and TAYLOR (1966) macht sich die Calciumbindungsfähigkeit des CaBP zunutze. Dabei wird die Konkurrenz zwischen dem zu bestimmenden CaBP und einem Kationenaustauschharz (Chelex 100, Bio Rad Laboratories, 200-400 mesh) um eine festgesetzte Menge radioaktiven Calciums ausgenutzt.

Nach der Zugabe von 0.5 ml Chelex-Trispuffer-Suspension (4.5 g Chelex / 25 ml Trispuffer) zu 1.0 ml Schleimhauthomogenat und anschließender kurzer Durchmischung (Vortex, 15 sec) werden 0.1 ml radioaktive CaCl_2 -Lösung (Amersham, 1 mCi / 200 ml Trispuffer) hinzugefügt und genau 15 sec auf dem Vortexgerät gerührt. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1 600 g kann eine Abtrennung des Kationen-austauschharzes erreicht werden.

Aus dem Überstand werden 0.2 ml zu 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1, Zinsser) in Zählfläschchen gegeben und vermischt. Mittels eines β -Szintillationszählers (Flüssigkeitsszintillations-zähler Packard TRICARB, Modell 3385) läßt sich die Zerfallsrate pro 20 min Meßzeit bestimmen. Durch die Messung der Gesamtradioaktivität der Probe und der Aktivität eines Blindwertes (Dreifachbestimmung) und eines Standards (Doppelbestimmung) kann CaBP in "Prozent Radioaktivität der Probe bezogen auf die Gesamtradioaktivität des Standards" angegeben werden.

Durch Multiplikation mit dem Faktor 8 erhält man die Korrektur auf 1 ml Schleimhauthomogenat. Durch Division mit dem Betrag Gesamtprotein der Probe (mg / ml Homogenat) erhält man schließlich "radioaktiv markiertes CaBP in Prozent bezogen auf die Gesamtradioaktivität in einem Milliliter Schleimhauthomogenat pro Milligramm Gesamtprotein".

4.9. Versuchsdurchführung

Die 16 Monate alten Tiere wurden zufällig auf die Käfige verteilt und 3 Tage mit Betriebsfutter weitergefüttert.

In der 14-tägigen Vorperiode wurden die Tiere mit einem, dem Futter der Kontrollgruppe im Versuch entsprechenden Versuchsfutter mit 2 000 IE Vitamin D₃ / kg gefüttert. Während dieser Vorperiode wurden die Legeleistung, der Brucheieranteil, der Windeieranteil und das absolute Gewicht der Eier gemessen und aufgezeichnet.

Daraus wurden dann Gruppen gleicher Leistungsstärke zusammengestellt. Dabei wurde auch auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Gruppenmitglieder über den gesamten Raum geachtet, um exogene Beeinflussungen auszuschließen.

Ab der Futterumstellung auf Versuchsfutter mit den Vitamin D₃-Metaboliten erfolgte bis zum 102. Tag (Versuchsende) die Messung der Legeparameter und der Eiparameter.

Am Versuchsende wurden die Legehennen gewogen und die Blutproben gewonnen. Sofort nach Tötung der Tiere wurde ein Dünndarmstück zur CaBP-Bestimmung herausgelöst und der rechte Ständer abgesetzt.

Während der ganzen Versuchsperiode betrug die Mortalität 5.45 % (3 Tiere). Alle wurden aufgrund schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert.

4.10. Einteilung der Versuchsgruppen

Es wurden balanciert nach Legeleistung, Brucheieranteil, Windeieranteil und absolutem Gewicht 5 Gruppen mit anfangs je 11 Tieren über 102 Versuchstage mit folgenden Treatments gefüttert:

Tab. 7		GRUPPENEINTEILUNG-HÜHNERVERSUCH (Grundfutter mit 2 000 IE Vitamin D ₃ /kg)
GRUPPE 1	KONTROLLGRUPPE	(n = 11)
GRUPPE 2	1,25-(OH) ₂ -D ₃ -GRUPPE	(n = 11)
	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ / kg	
GRUPPE 3	1,25-(OH) ₂ - UND 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ -GRUPPE	(n = 11)
	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ und 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ / kg	
GRUPPE 4	1,25-(OH) ₂ - UND 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ - UND VITAMIN C-GRUPPE	(n = 10)
	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ und 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ und 100 mg Vitamin C / kg	
GRUPPE 5	24,25-(OH) ₂ -D ₃ - UND VITAMIN C-GRUPPE	(n = 9)
	20 µg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ und 100 mg Vitamin C / kg	

4.11. Versuchsergebnisse

Statistische Untersuchungsmethode

Die Versuchsergebnisse wurden immer nach dem Student'schen T-Test (nach BRONSTEIN and SEMENDJAJEW, 1987) auf Signifikanz untersucht. Dabei wurden stets die Metabolitgruppen auf die Kontrollgruppe bezogen. Als signifikant wurde ein Ergebnis bezeichnet mit $p \leq 0.1$ (*), $p \leq 0.05$ (**), $p \leq 0.005$ (***) und $p \leq 0.001$ (****).

Legeparameter

Legeleistung

Die Legeleistung wurde über 102 Tage berechnet:

Tab. 7 LEGELEISTUNG [%]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	63.55	3.16
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	69.07	2.90
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	67.74	3.79
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	72.55 *	3.81
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	72.66	5.79

* = signifikant mit $p \leq 0.1$

Brucheieranteil

Tab. 8 BRUCHEIERANTEIL [%]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{x}$
1	Kontrolle	5.25
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	5.79
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	8.91
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	5.88
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	5.12

Windeieranteil

Tab. 9 WINDEIERANTEIL [%]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{x}$
1	Kontrolle	0.80
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	2.41
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	2.50
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	0.98
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	0.44

EiparameterEigewicht

Hierbei wurde die Summe pro Gruppe errechnet und dann auf den Durchschnitt pro Tier einer Gruppe bezogen:

Tab. 10 SUMME DER EIGEWICHTE [g]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	4198.3	265.2
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	4536.0	331.7
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	4264.4	391.4
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	5175.8 **	276.8
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	4869.3	371.6

** = signifikant mit $p \leq 0.05$

Spezifisches Gewicht des Eies

Tab. 11 SPEZIFISCHES GEWICHT / EI [g / ml]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	1.09	.00
2	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	1.08	.00
3	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	1.08	.00
4	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	1.08	.00
5	20 µg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	1.08	.00

Bruchfestigkeit

Tab. 12 BRUCHFESTIGKEIT / EI [N]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	4.60	0.3
2	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	4.33	0.3
3	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	4.45	0.3
4	2 µg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 µg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	3.98	0.3
5	20 µg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	3.78	0.3

Eischalendicke

Tab. 13 EISCHALENDICKE [mm]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	0.36	0.01
2	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$	0.34	0.02
3	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$	0.35	0.02
4	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	0.36	0.01
5	20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	0.35	0.01

Trockeneischalengewicht

Hierbei wurde die gesamte Menge der Trockeneischalengewichtsausscheidung pro Gruppe errechnet und dann auf den Durchschnitt pro Tier einer Gruppe bezogen.

Dies stellt ein Maß für die Calciumausscheidung pro Versuchszeitraum dar, da die Eischale einen recht konstanten Calciumgehalt von 40 % hat.

Tab. 14 SUMME DER TROCKENEISCHALENGEWICHTE [g]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	359.0	25.9
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	369.7	34.2
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	358.3	36.1
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	424.3 *	23.3
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	396.9	36.5

* = signifikant mit $p \leq 0.1$

Tab. 15 TROCKENEISCHALENGEWICHT / EI [g]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	5.70	.18
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	5.38	.38
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	5.19	.30
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	5.73	.33
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	5.39	.19

Prozentuales Eischalengewicht

Tab. 16 PROZENTUALES EISCHALENGEWICHT [%]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	8.55	.14
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	8.15	.42
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	8.40	.43
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	8.20	.27
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	8.17	.30

Eioberfläche

Tab. 17 SUMME DER EIOBERFLÄCHEN [cm]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$
1	Kontrolle	1212.34
2	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃	1279.67
3	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	1228.06
4	2 μg 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μg 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	1397.34
5	20 μg 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	1339.97

Körpergewicht

Tab. 18

KÖRPERGEWICHT [kg]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	2.42	.096
2	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$	2.41	.060
3	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$	2.19	.114
4	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	2.30	.092
5	20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	2.42	.084

Knochenasche

Tab. 19

RELATIVE KNOCHENASCHE [%]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	43.4	2.02
2	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$	40.5	.89
3	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$	41.1	.95
4	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	40.3	.78
5	20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	41.6	1.84

Blutparameter

Tab. 20 SERUMCALCIUM [mg / 100 ml]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	24.1	1.07
2	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃	23.8	1.21
3	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μ g 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	24.8	1.25
4	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μ g 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	26.2	1.55
5	20 μ g 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	22.6	1.05

Tab. 21 SERUMPHOSPHAT [mg / 100 ml]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$
1	Kontrolle	6.47
2	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃	6.79
3	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μ g 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃	7.32
4	2 μ g 1,25-(OH) ₂ -D ₃ + 2 μ g 1,24,25-(OH) ₃ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	7.57
5	20 μ g 24,25-(OH) ₂ -D ₃ + 100 mg Vitamin C	6.96

Tab. 22 SERUM-ALKALISCHE PHOSPHATASE [U / l]

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$
1	Kontrolle	283
2	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$	363
3	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$	283
4	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	285
5	20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	254

Calcium Binding Protein

Tab. 23 CALCIUM BINDING PROTEIN

GRUPPE	Zusatz/kg Futter	$\bar{X}$	$\pm S\bar{X}$
1	Kontrolle	2.18	0.39
2	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$	3.02	0.50
3	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$	2.43	0.55
4	2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	2.07	0.44
5	20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C	2.69	0.50

5. DISKUSSION

5.1. Die biologische Aktivität des 26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferols

Der Wachteleischalentest stellt ein erprobtes und anerkanntes Verfahren zur Messung der biologischen Wirksamkeit von neuen Vitamin D₃-Metaboliten im Vergleich zu bekannt wirksamen Vitamin D₃-Metaboliten dar (KOPP, 1985; RAMBECK et al., 1985; RAMBECK et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie biologisch aktiv und wirksam der neue deuterierte 1,25-(OH)₂-D₃-Metabolit im Vergleich zu dem bereits mehrfach getesteten 1,25-(OH)₂-D₃ ist.

Dieses 26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol ist bislang noch nicht in vivo getestet und nur von USKOKOVIC et al. (1988) in vitro eingesetzt worden. Daher liegen noch keine Angaben zur biologischen Aktivität des deuterierten 1,25-(OH)₂-D₃-Metaboliten vor.

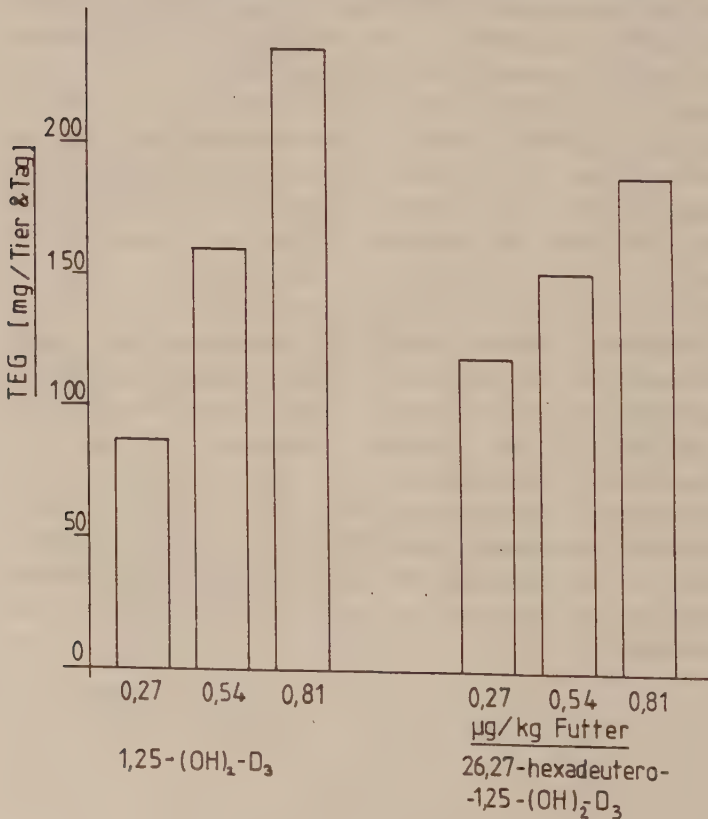
USKOKOVIC et al. (1988) erwarten eine längere biologische Halbwertszeit im Vergleich zum nicht deuterierten 1,25-(OH)₂-D₃. Sie zeigen in ihren vorläufigen Ergebnissen, daß 26,27-Hexadeutero-1,25-(OH)₂-D₃ bei gleicher Dosierung (12 µg / kg Futter) wie 1,25-(OH)₂-D₃ bei der Ratte eine um 8 % verminderte Calciumabsorption und eine um 36 % geringere Calciummobilisation aus dem Knochen erzeugt. Diese um ein Drittel verminderte Calciummobilisation würde diese Nebenwirkung der Vitamin D₃-Metaboliten verringern.

USKOKOVIC untersucht auch noch die kompetitive Bindungsaffinität zum $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Rezeptor in vitro und findet keine Unterschiede zwischen dem Hexadeutero- $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ und dem $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$.

Bei der Untersuchung der Calciausscheidung via Eischale als Parameter für die biologische Aktivität des neuen Metaboliten wurden der deuterierte $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Metabolit und $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ in der gleichen Dosierung eingesetzt.

Abb. 1

TROCKENEISCHALENGEWICHT WACHTELVERSUCH

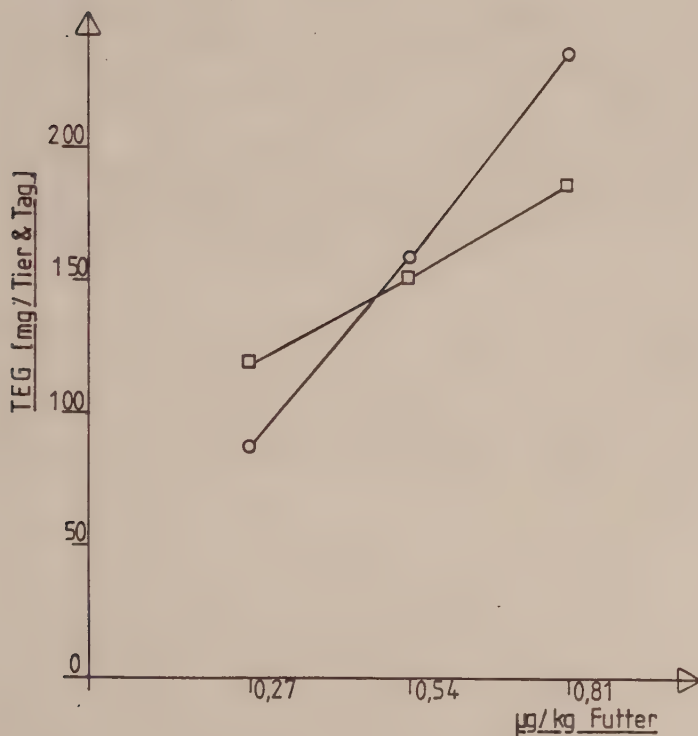


Hier zeigte sich, daß der deuterierte 1,25-(OH)₂-D₃-Metabolit in der niedrigen Dosierung von 0.27 µg / kg Futter eine höhere biologische Wirksamkeit besitzt als der 1,25-(OH)₂-D₃-Metabolit. In der mittleren Dosierung (0.54 µg / kg Futter) hingegen ließ dieser Effekt nach und die Wirkung war bei der höchsten Dosierung (0.81 µg / kg Futter) sogar geringer.

Durch die statistische Überprüfung des ebenfalls eingesetzten Vitamin D₃-Standards (4.11.) wurde die Auswertbarkeit des Vergleiches der biologischen Wirkungen gesichert.

Abb. 2

**TROCKENEISCHALENGEWICHT WACHTELVERSUCH
DOSIS-WIRKUNGS-GERADEN**



Die Dosis-Wirkungsgeraden des deuterierten und des nicht deuterierten $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Metaboliten waren nicht vergleichbar, da sie unterschiedliche Steigungsfaktoren aufwiesen.

Damit zeigte der 26,27-Hexadeutero- $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Metabolit im Wachteilechalentest kein ähnliches Wirkungsprinzip wie $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$.

Dies läßt vermuten, daß die beiden Metaboliten unterschiedliche Stoffwechselwege und intermediäre Angriffspunkte haben. Nach den vorläufigen Ergebnissen von USKOKOVIC et al. (1988) unterscheiden sie sich in vitro nicht in der Bindungsaffinität zum $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Rezeptor. Daher muß ein anderer Unterschied im Wirkungsprinzip vorliegen.

Es bleibt offen, ob der deuterierte $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ -Metabolit wirklich eine längere Halbwertszeit hat.

Nach den Ergebnissen dieses Versuchs scheint 26,27-Hexadeutero- $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ nur in einer niederen Dosierung mehr biologische Wirksamkeit als $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ zu besitzen.

Dieser Wirkungsunterschied und die Stoffwechselwege des 26,27-Hexadeutero- $1,25$ -dihydroxycholecalciferols bedürfen noch weiterführender und genauerer Untersuchungen.

5.2. Die Wirkung von Vitamin C-Zusätzen auf die biologische Aktivität von Vitamin D₃-Metaboliten

Im zweiten Teil des Wachteleischalenversuches sollte die von WEISER et al. (1988) und WEISER et al. (1989) beschriebene stimulierende Wirkung von Vitamin C-Zusatz auf die Vitamin D₃-Metabolitwirkung untersucht werden. WEISER et al. (1988) beobachten diesen synergistischen Effekt bisher nur am Hühnerküken, das in den ersten 14 Lebenstagen relativ Vitamin C-arm ist, da die Vitamin C-Eigensynthesefähigkeit unvollständig entwickelt ist (WEISER et al., 1989).

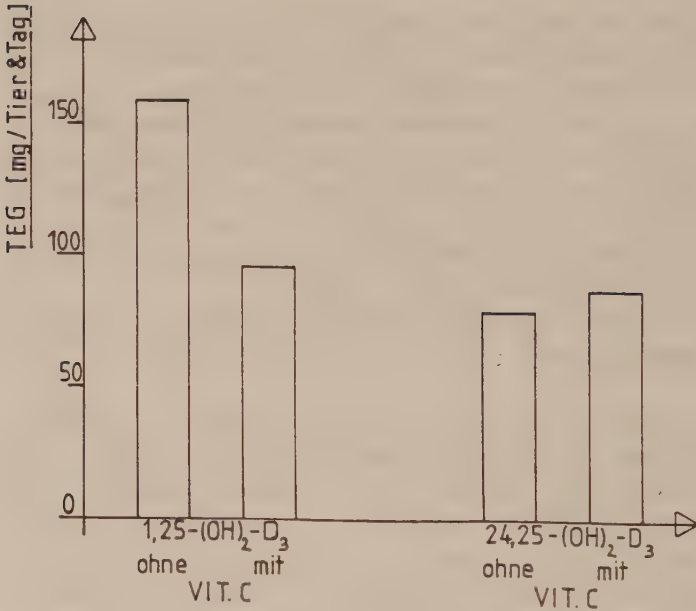
Die Legewachteln aber können intermediär Vitamin C synthetisieren.

In Vorversuchen wurde bereits ermittelt in welcher Dosierung die Vitamin D₃-Metaboliten 1,25-(OH)₂-D₃ und 24,25-(OH)₂-D₃ sicher im linearen Bereich der Dosis-Wirkungskurve liegen. Um den stimulierenden Effekt des Vitamin C auf die Vitamin D-Metabolitwirkung zu untersuchen, wurde nun Vitamin C bei dieser Vitamin D-Metabolit-Dosierung dem Futter in einer Menge von 100 mg / kg zugesetzt.

Es konnte im Wachteleischalentest keine signifikante Verbesserung der biologische Wirkung des 24,25-(OH)₂-D₃ durch Vitamin C-Zusatz gezeigt werden. Die Gruppenabweichungen lagen im Bereich der Zufallsstreuung. Für 1,25-(OH)₂-D₃ konnte im Wachteleischalentest sogar ein signifikant negativer Effekt durch Vitamin C-Zusatz nachgewiesen werden.

Abb. 3

TROCKENEISCHALENGEWICHT WACHTELVERSUCH
MIT UND OHNE VITAMIN C-ZUSATZ



WEISER et al. (1989) vermuten, daß Vitamin C ein möglicher Faktor für die verbesserte Umsetzung von $24,25-(OH)_2-D_3$ zu einer aktiveren Form ist. Dies kann im Wachteleischaalenversuch nicht bestätigt werden.

Entweder unterscheidet sich der $24,25-(OH)_2-D_3$ -Stoffwechsel von Legewachtel und Hühnerküken oder die Legewachtel ist aufgrund ihrer Vitamin C-Eigensynthese aus dem Grundfutter bereits ausreichend Vitamin C versorgt.

5.3. Der Einsatz von Vitamin D₃-Metaboliten mit und ohne Vitamin C-Zusatz im Legehennenversuch

Im Legehennenversuch sollten die Vitamin D₃-Metaboliten 1,25-(OH)₂-D₃, 1,24,25-(OH)₃-D₃ und 24,25-(OH)₂-D₃, allein oder in Kombination miteinander und in Kombination mit Vitamin C bei alten Legehennen am Ende der Legeperiode eingesetzt werden.

Ziel war es, die bei alten Legehennen trotz ausreichender Vitamin D-Versorgung (2 000 IE / kg Futter) am Ende der Legeperiode auftretenden, die Wirtschaftlichkeit begrenzenden Legeleistungs- und Eischalenqualitätsprobleme durch den Einsatz von Vitamin D₃-Metaboliten zu verbessern.

Als Bezug wurde die Kontrollgruppe mit 2 000 IE Vitamin D₃ / kg Futter gewählt und alle Ergebnisse mit dieser Kontrollgruppe verglichen.

Bei den Legeparametern waren "Brucheieranteil" und "Windeieranteil" eher negativ von den Vitamin D₃-Metaboliten beeinflusst. Der Brucheieranteil der Metabolitgruppen schwankte zwischen 5 % und 9 % (Tab. 8), ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit 5 % Brucheieranteil zu ergeben. Der Windeieranteil lag zwischen 0.5 % und 2.5 % (Tab. 9). Aber bei der relativ kleinen Anzahl an schalenschwachen Eiern (Bruch- und Windeier) ist dies kritisch zu betrachten, da ein einzelnes Tier praktisch die ganze Gruppe bestimmte.

ROLAND (1976) gibt einen Anteil der schalenschwachen Eier in der Legehennenhaltung von 6 % bis 12 % an.

ABE et al. (1982) beschreiben bei 20 Monate alten Legehennen sogar 21 % schalenschwache Eier.

Der Anteil schalenschwacher Eier in diesem Versuch mit lag mit 6 bis 11 % im Normbereich.

Die Parameter "Spezifisches Gewicht des Eies" (Tab. 11) und "Eischalendicke" (Tab. 13) ergaben keine Abweichungen von Vitamin D₃-Metabolitzusätzen gegenüber der Kontrollgruppe und innerhalb der Metabolitgruppen, obwohl die Werte nur eine geringe Streuung aufwiesen.

Offensichtlich wird das spezifische Gewicht der Eier und die Eischalendicke nicht durch die Gabe von Vitamin D₃-Metaboliten beeinflusst.

Falls die Metabolitwirkung nur ganz geringe Änderungen erzeugen würde, gäbe es Meßmethoden, die die hier angewandte an Genauigkeit übertreffen.

So beschreiben FAGAN et al. (1988) eine computerkompatible elektronische Eischalendicke-Meßmethode mit deutlich besserer Präzision. Damit können selbst geringe Änderungen repräsentativ erfaßt werden. Für die Bestimmung des spezifischen Gewichtes wäre ebenfalls eine größere Genauigkeit mit der CADW-Methode (Computer-Assisted Displaced-Water) nach HEMPE et al. (1988) zu erwarten.

Aber wenn sich das spezifische Gewicht oder die Eischalendicke deutlich ändern würden, wäre dies auch mit der im Versuch angewandte Methodik zu zeigen gewesen.

Der berechnete Parameter "prozentuales Eischalengewicht", der ein Maß für die Eischalenqualität darstellt, erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen und der Kontrollgruppe (Tab. 16). Das prozentuale Eischalengewicht gibt den Anteil der Schale am Eigewicht an und ist daher mit der Eischalendicke ein Maß für den Calciumgehalt pro Ei. Bei beiden Parametern besteht kein deutlicher Unterschied zur Kontrollgruppe.

Auch beim Körpergewicht wurden keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Tab. 18). Bei ad libitum Fütterung mit ausreichend balanciertem Grundfutter war keine Mangelversorgung und daher auch kein Einfluß auf das Körpergewicht zu erwarten. Dies ist auch als Zeichen dafür zu werten, daß von den Vitamin D₃-Metaboliten kein abträglicher Einfluß auf den Stoffwechsel ausgeht, wie er bei verschiedenen Vitamin D₃-Metaboliten als Hypervitaminose beschrieben ist.

Auch BAR et al. (1988) können bei der Gabe von 1 α -(OH)-D₃ in unterschiedlichen Dosierungen (0.0, 2.5 und 5.0 μ g / kg Futter) keinen Einfluß auf das Körpergewicht feststellen, obwohl 1-(OH)-D₃ als der toxischste Vitamin D₃-Metabolit gilt.

Die Serumcalciumwerte schwankten zwischen 23 und 26 mg Serumcalcium / 100 ml, ohne Unterschiede zwischen Vitamin D₃-Metabolitzusatz und Kontrollgruppe erkennen zu lassen. Der Schwankungsbereich stimmt in etwa mit dem von BAR et al. (1988) mit 22 - 24 mg / 100 ml sowie dem von GOODSON-WILLIAMS et al. (1986) mit 25 - 30 mg / 100 ml überein.

Die Phosphatbestimmung ergab bei allen 4 Versuchsgruppen höhere Serumphosphatwerte als in der Kontrollgruppe (Tab. 21), die aber innerhalb der Zufallsstreuung lagen.

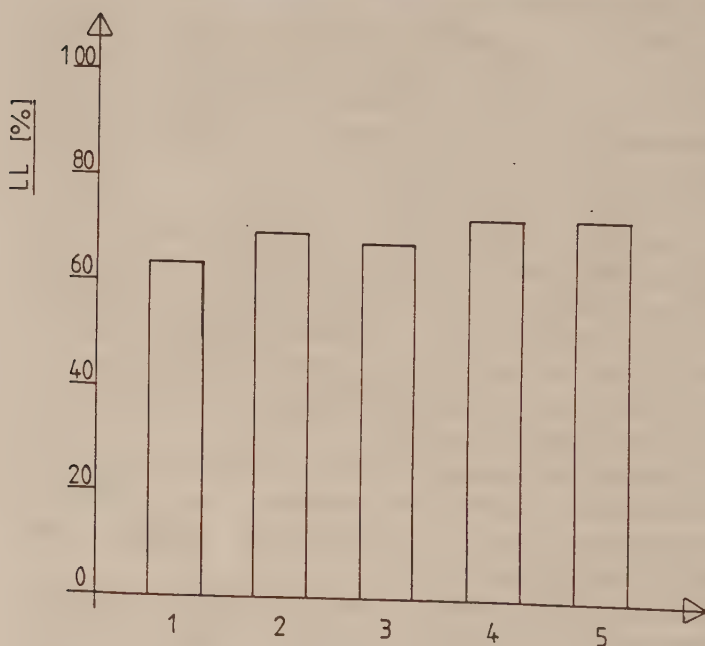
Die gruppenweise gepoolte Bestimmung der Alkalischen Phosphatase im Serum zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Tab. 22). Der hohe Wert bei der 1,25-(OH)₂-D₃-Gruppe ist vermutlich ein analytischer Fehler.

Insgesamt konnte also aus den Blutwerten keine Information über Vitamin D₃-metabolitgesteuerte Vorgänge im Stoffwechsel alter Legehennen erbracht werden.

Der wirtschaftlich bedeutendste Faktor in der Legehennenhaltung ist die Legeleistung. Bei der Zufütterung von Vitamin D₃-Metaboliten mit und ohne Vitamin C-Zusatz wurden durchwegs deutlich höhere Legeleistungen erzielt als in der nur mit 2 000 IE Vitamin D₃ versorgten Kontrollgruppe.

Abb. 4

LEGELEISTUNG LEGEHENNENVERSUCH



1 = Kontrolle

2 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃

3 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃ + 2 µg 1,24,25-(OH)₃-D₃

4 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃ + 2 µg 1,24,25-(OH)₃-D₃
+ 100 mg Vitamin C

5 = 20 µg 24,25-(OH)₂-D₃ + 100 mg Vitamin C

Die Zufütterung von 2 μg $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ / kg Futter erbrachte bei den alten Legehennen einen Zuwachs der Legeleistung um 9 % gegenüber der Kontrollgruppe. Durch 2 μg $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ in Kombination mit 2 μg $1,24,25\text{-(OH)}_3\text{-D}_3$ / kg Futter wurden 7 % Legeleistungsverbesserung erreicht. Scheinbar existiert daher für die Legeleistung beim alten Legehuhn keine synergistische Wirkung der beiden Metaboliten.

Durch Vitamin C-Zusatz (100 mg / kg Futter) zu Vitamin D_3 -Metaboliten konnte eine noch höhere Steigerung der Legeleistung erreicht werden. So bewirkten 100 mg Vitamin C mit 2 μg $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ und 2 μg $1,24,25\text{-(OH)}_3\text{-D}_3$ / kg Futter und ebenfalls 100 mg Vitamin C mit 20 μg $24,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ / kg Futter je eine signifikante Erhöhung der Legeleistung um 14 %.

Scheinbar bewirkt der Vitamin C-Zusatz zusätzlich zu den Vitamin D_3 -Metaboliten eine Verbesserung der Vitamin D_3 -Wirksamkeit. Oder aber der Vitamin C-Zusatz für sich allein stimuliert die Legeleistung und die Calciumausscheidung. Dies ist besonders beachtenswert, da die Legehennen selbst Vitamin C synthetisieren können. Der von WEISER et al. (1988) und WEISER et al. (1989) beschriebene fördernde Effekt von Vitamin C-Zusatz auf den Vitamin D-Stoffwechsel wurde nämlich nur an relativ Vitamin C-armen Hühnerküken festgestellt.

Bei dem Vergleich der Vitamin D_3 -Metaboliten zeigte sich, daß die Kombination $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ mit $1,24,25\text{-(OH)}_3\text{-D}_3$ keine Vorteile, sondern eher geringere Werte gegenüber $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ allein ergab. Dies steht im Gegensatz zu dem von RAMBECK et al. (1988) an relativ Vitamin D-armen Legewachteln gezeigten synergistischen Wirkungen dieser beiden Metaboliten.

Bisher wurde noch nicht erfolgreich versucht zu einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung des Grundfutters Vitamin D₃-Metabolite mit oder ohne Vitamin C-Zusatz zuzusetzen. HARMS et al. (1988) erzielten in einem vom Versuchsaufbau nicht vergleichbaren Legehennenversuch bei Zusatz von 4 µg 1,25-(OH)₂-D₃ pro kg Futter zusätzlich zu einer ausreichenden Vitamin D₃-Versorgung eine Verschlechterung der Legeleistung und sinkendes Eigewicht. TSANG et al. (1988) berichten von unveränderter Schalenqualität bei 1,25-(OH)₂-D₃-Zusatz zum Grundfutter, ebenso wie CASTALDO and MAURICE (1988) bei intramuskulärer Gabe von Calcitriol. Ein Legeleistungszuwachs dieser Größenordnung wurde bisher bei ausreichender Grundfutterqualität nicht beschrieben.

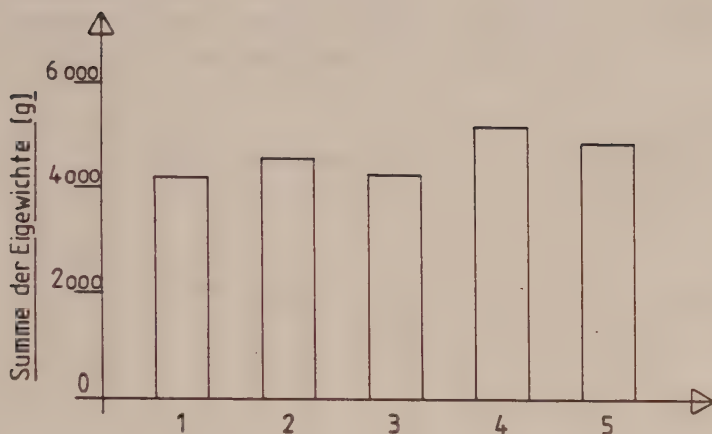
Die Eioberfläche und das Eigewicht stellt ebenso wie das Trockeneischalengewicht einen guten Parameter für die Calciumausscheidung via Eischalendrüse dar.

Die Eioberflächen lagen bei allen Metabolitgruppen über denen der Kontrollgruppe. Deutliche Erhöhungen zeigten vor allem die Gruppen mit Vitamin C-Zusatz (10 % bzw 15 %).

Unter der Bedingung, daß die Eischalendicke in etwa gleich bleibt, wie in diesem Versuch gegeben, stellt die Eioberfläche ein gutes Maß für die Calciummenge dar, die ein Legehuhn mit den Eiern ausschied.

Abb. 5

EIGEWICHTE - LEGEHENNENVERSUCH

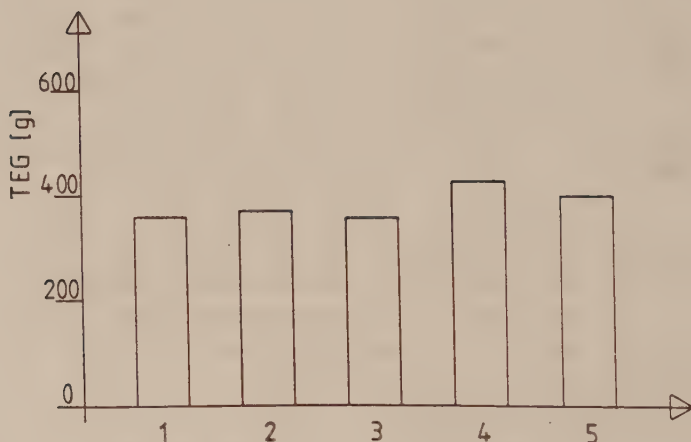


- 1 = Kontrolle
2 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃
3 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃ + 2 µg 1,24,25-(OH)₃-D₃
4 = 2 µg 1,25-(OH)₂-D₃ + 2 µg 1,24,25-(OH)₃-D₃
+ 100 mg Vitamin C
5 = 20 µg 24,25-(OH)₂-D₃ + 100 mg Vitamin C

Alle Metabolitgruppen hatten höhere Eigewichte als die Kontrollgruppe. Besonders die beiden Gruppen mit Vitamin C-Zusatz zu den Vitamin D₃-Metaboliten zeigten stark erhöhte Werte mit einem Zuwachs von 23 % und 16 % gegenüber der Kontrollgruppe.

Abb. 6

TROCKENEISCHALENGEWICHT - LEGEHENNENVERSUCH



1 = Kontrolle

2 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$

3 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$

4 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$
+ 100 mg Vitamin C

5 = 20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C

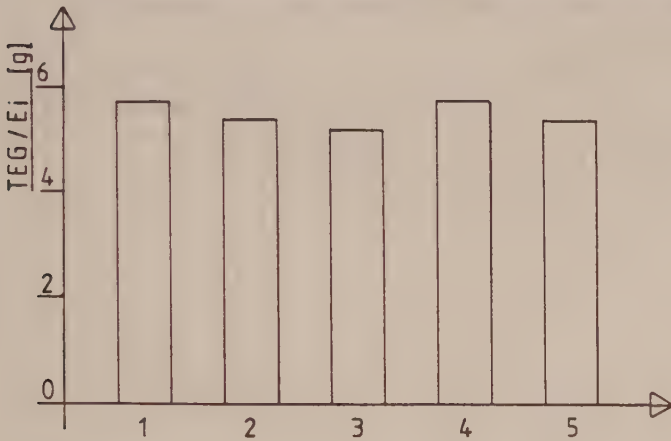
Das Trockeneischalengewicht lag bei den beiden Vitamin C-Kombinationsgruppen um 18 % bzw 11 % über der Kontrollgruppe. Der Zusatz von 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ erbrachte nur eine Steigerung um 3 %. Durch die Kombination von 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ und 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$ wurde keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe erreicht.

Es wurde also vor allem in den mit Vitamin C-Zusatz gefütterten Legehennengruppen deutlich mehr Calcium ausgeschieden. Dies ermöglicht erst das oben erwähnte höhere Eigewicht und das starke Ansteigen der Legeleistung.

Jedoch konnte das Ansteigen der Calciumausscheidung nicht in mehr Calcium pro einzelnes Ei umgesetzt werden, wie der Bezug TEG / Ei zeigt:

Abb. 7

TROCKENEISCHALENGEWICHT / EI - LEGEHENNENVERSUCH



1 = Kontrolle

2 = 2 μg $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$

3 = 2 μg $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ + 2 μg $1,24,25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$

4 = 2 μg $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ + 2 μg $1,24,25-(\text{OH})_3\text{-D}_3$
+ 100 mg Vitamin C

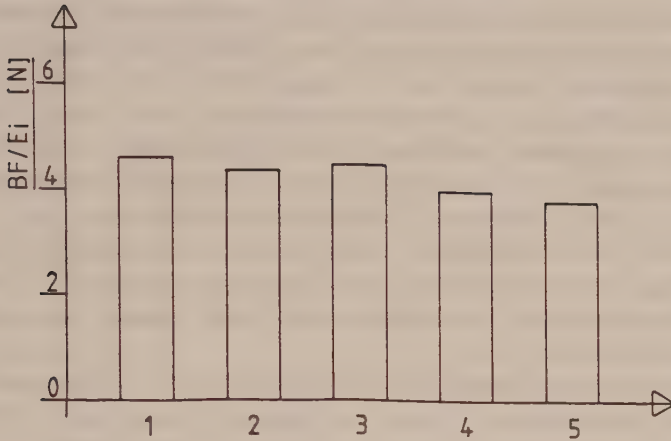
5 = 20 μg $24,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ + 100 mg Vitamin C

Die Trockeneischalengewichte pro Ei (Tab. 15) lagen eher unter denen der Kontrollgruppe. Lediglich die 1,25-(OH)₂-D₃ mit 1,24,25-(OH)₃-D₃ und Vitamin C-Gruppe hatte Werte leicht über der Kontrollgruppe. Damit wurde in jedes einzelne Ei eher weniger Calcium deponiert, allerdings jeweils zusammenhängend mit einem deutlichen Anstieg der Legeleistung. Alte Legehennen scheinen also in der Lage zu sein, bei Zufütterung von Vitamin D₃-Metaboliten ihre Legeleistung stark zu erhöhen ohne dabei den Calciumgehalt der Eischale, und damit die Eischalenqualität, signifikant zu beeinflussen.

Ein direktes Verfahren zur Messung der Eischalenqualität, insbesondere unter dem Gesichtspunkt handelsüblicher Belastungen (HAMILTON, 1982), ist die Bruchfestigkeitsmessung:

Abb. 8

BRUCHFESTIGKEIT / EI - LEGEHENNENVERSUCH



1 = Kontrolle

2 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$

3 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$

4 = 2 μg 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 2 μg 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$
+ 100 mg Vitamin C

5 = 20 μg 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$ + 100 mg Vitamin C

Es wurden bei allen Vitamin D₃-Metabolitgruppen etwas geringere Bruchfestigkeiten festgestellt, die aber alle nicht signifikant waren. Die etwas schlechtere Bruchfestigkeit stand jeweils in einem Bezug zur Legeleistung der Gruppe, da Gruppen mit höherer Legeleistung eine jeweils etwas niedrigere Bruchfestigkeit aufwiesen.

Damit zeigte sich wie beim Parameter "TEG / Ei", daß die insgesamt erhöhte Calciumausscheidung der alten Legehenne erst die erhöhte Legeleistung und Eigewichte bei in etwa gleicher Eischalenqualität ermöglicht.

Dies deutet darauf hin, daß die Legeleistung möglicherweise durch die Calciummenge, die der Eischalendrüse zur Verfügung steht, reguliert und limitiert wird.

Die erhöhte Calciumausscheidung kann durch mehr Calciumresorption über den Darm oder durch mehr Calciummobilisation aus dem Knochen erklärt werden.

Um dies zu beurteilen, wurde die relative Knochenasche bestimmt. Hier war eine geringe Erniedrigung bei allen Vitamin D₃-Metabolitgruppen, die aber im Bereich der Zufallsstreuung lag, zu verzeichnen (Tab. 19). Allerdings wurde diese Untersuchung aus technischen Gründen nicht an den langen Röhrenknochen durchgeführt, die beim Huhn als "Legeknochen" mit hohem Calcium- Ein- und Ausbau gelten.

Somit kann über eine Calciummobilisierung aus dem Knochen keine endgültige Aussage getroffen werden. Aber über den relativ langen Versuchszeitraum von 102 Tagen fand zumindest kein dramatischer, pathologischer Calciumabbau im Knochen statt.

Die Aufnahme von Calcium aus dem Darm wird anhand der Aktivität des CaBP beurteilt. Die CaBP-Werte (Tab. 23) lagen bei drei Versuchsgruppen zwar höher als die der Kontrollgruppe, wiesen jedoch eine zu große Streuung auf, um statistisch vertraulich auswertbar zu sein.

Die Methode der Bestimmung ist an den Exitus der Tiere gebunden und erfaßt damit Tiere während der Eiablage und Tiere ohne momentane Legetätigkeit. BAR et al. (1978b) zeigen große Unterschiede der intestinalen CaBP-Werte zwischen momentan legenden und momentan nicht legenden Legehennen. Um die Gruppen zu vergleichen und die Streuung zu vermindern, müßten also alle Legehennen in einem synchronen Legestatus getötet werden. Dies ist aus versuchstechnischen Gründen unmöglich.

Damit bleibt offen, woher die erhöhte Calciumausscheidung der Eischalendrüse kommt. Dies wäre eventuell durch einen Stoffwechselkäfigversuch abzuklären.

Da diese deutliche Zunahme von Legeleistung und Eigewichtsausscheidung einen wirtschaftlichen Einsatz von Vitamin D₃-Metabolitzufütterung mit und ohne Vitamin C rechtfertigen würde, wären weiterführende Untersuchungen über genaue Dosis-Wirkungsbeziehungen interessant.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Aktivität natürlicher und synthetischer Vitamin D₃-Metabolite und der Kombination von Vitamin D₃-Metaboliten an zwei Tiermodellen untersucht. Sowohl bei der japanischen Wachtel, als auch bei der Legehennen wurde die Calciumausscheidung über das Ei als Vitamin D-abhängiger Parameter bestimmt.

Im Wachteleischalentest erwies sich der neue deuterierte Vitamin D₃-Metabolit 26,27-Hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol als etwa gleich wirksam wie das natürliche Vitamin D-Steroidhormon 1,25-(OH)₂-D₃. Die in der Literatur postulierte höhere antirachitische Wirkung des deuterierten Vitamin D₃-Metaboliten konnte nicht bestätigt werden. Eine stimulierende Wirkung von Vitamin C auf die Aktivität von Vitamin D₃-Metaboliten wurde im Wachteleischalentest ebenfalls nicht beobachtet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Legehennenversuch an ausreichend mit Vitamin D versorgten Legehennen, die sich am Ende der Legeperiode befanden, durchgeführt. Die Vitamin D₃-Metaboliten 1,25-(OH)₂-D₃, 1,25-(OH)₂-D₃ in Kombination mit 1,24,25-(OH)₃-D₃, sowie die Kombination 1,25-(OH)₂-D₃ mit 1,24,25-(OH)₃-D₃ und Vitamin C und die Kombination 24,25-(OH)₂-D₃ mit Vitamin C erbrachten alle gegenüber der Kontrollgruppe eine höhere Legeleistung und eine vermehrte Calciumausscheidung. Die Eischalenqualität blieb trotz erhöhter Calciumausscheidung in etwa erhalten. Blutparameter, intestinales Calcium bindendes Protein, Körpergewicht und Gesundheitszustand unterschieden sich nicht

signifikant von der Kontrollgruppe. Die erzielte Erhöhung der Legeleistung um bis zu 15 % könnte wirtschaftlich interessant sein.

7. SUMMARY

THE EFFECT OF VITAMIN D₃-METABOLITES ON EGG-PARAMETERS OF LAYING HEN AND JAPANESE QUAIL

In the present study the biological activity of natural and synthetical vitamin D₃-metabolites and the combination of vitamin D₃-metabolites was tested in two animal-models. In the japanese quail and in the laying hen the calcium-excretion via eggshell was determined as a vitamin D-dependent parameter.

In Japanese quail egg shell test the recently synthesized deuterated vitamin D₃-metabolite 26,27-hexadeutero-1,25-dihydroxycholecalciferol had the same activity as the natural vitamin D-steroidhormon 1,25-(OH)₂-D₃. In the literature a higher antirachitic activity of the deuterated vitamin D₃-metabolite is postulated. This was not true in our examinations. A stimulating effect of vitamin C on the activity of vitamin D-metabolites in the Japanese quail egg shell test was not shown either.

In the second part of this study a laying hen experiment was done with vitamin D fed laying hens at the end of lay. The vitamin D metabolites 1,25-(OH)₂-D₃, 1,25-(OH)₂-D₃ in combination with 1,24,25-(OH)₃-D₃, the combination 1,25-(OH)₂-D₃ with 1,24,25-(OH)₃-D₃ and vitamin C and the combination 24,25-(OH)₂-D₃ with vitamin C all showed a higher laying performance and a higher calcium-excretion than the control group. The eggshell-quality was not reduced through calcium-excretion went up. Blood parameters,

intestinal calcium binding protein, body-weight and health did not change significantly as compared to the control. This improvement of laying performance up to 15 % may be of economical interest.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, E., H. HORIKAWA, T. MASUMURA, M. SUGAHARA, M. KUBOTA and T. SUDA (1982)
Disorders of cholecalciferol metabolism in old egg-laying hens.
J. Nutr. 112, 436-446
- ABDULRAHIM, S. M.B. PATEL and J. MCGINNIS (1979)
Effect of vitamin D₃ metabolites on production parameters and hatchability of eggs.
Poult. Sci. 58, 858-863
- AMEENUDDIN, S., M.L. SUNDE, H.F. DeLUCA and M.E. COOK (1986)
Excessive cholecalciferol in a layers diet: decline in some aspects of reproductive performance and increased bone mineralisation of progeny.
British Poultry Science 27, 671-677
- AMEENUDDIN, S., M.L. SUNDE and H.F. DeLUCA (1987)
Lack of response of bone mineralization of chicks fed egg yolks from hens on dietary 1,25-dihydroxy-cholecalciferol.
Poult. Sci. 66, 1829-1834
- ANDREWS, D.K, W.D. BERRY and J. BRAKE (1987)
Effect of lighting programm and nutrition on reproductive performance of molted Single Comb White Leghorn hens.
Poult. Sci. 66, 1298-1305

AUSTIC, R.E. (1984)

Excess dietary chloride depresses egg shell quality.

Poult. Sci. 63, 1773-1777

AUSTIC, R.E. and K. KESHAVARZ (1988)

Interaction of dietary calcium and chloride and the influence of monovalent minerals on eggshell quality.

Poult. Sci. 67, 750-759

BALVANE, D. and I. YOSELEWITZ (1987)

The relation between sodium chloride concentration in drinking water and egg-shell damage.

British J. Nutr. 58, 503-509

BAR, A. and S. HURWITZ (1973)

Uterine calcium binding protein in the laying fowl.

Comp. Biochem. Physiol. 45, 579-586

BAR, A., A. COHEN, U. EISNER, G. RISENFELD and S. HURWITZ (1978 a)

Differential response of calcium transport system in laying hens to exogenous and endogenous changes in vitamin D status.

J. Nutr. 108, 1322-1328

BAR, A., A. COHEN, S. EDELSTEIN, M. SHEMESH, G. MONTECUCCOLI and S. HURWITZ (1978 b)

Involvement of cholecalciferol metabolism in birds in the adaptation of calcium absorption to the needs during reproduction.

Comp. Biochem. Physiol. 49, 245-249

- BAR, A., J. ROSENBERG and S. HURWITZ (1984)
The lack of relationships between vitamin D₃ metabolites and calcium binding protein in the eggshell gland of laying birds.
Comp. Biochem. Physiol. 78, 75-79
- BAR, A., S. STRIEM, J. ROSENBERG and S. HURWITZ (1988)
Egg shell quality and cholecalciferol metabolism in aged laying hens.
J. Nutr. 118, 1018-1023
- BAUMEISTER, M. (1973)
Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-Bestimmung.
Vet. Med. Diss., München
- BROMMAGE, R., K. JARNIGAN, H.F. DeLUCA, S. YAMADA and H. TAKAYAMA (1983)
1-But not 24-hydroxylation is required for skeletal mineralisation in rats.
Am. J. Physiol. 244, E293-E304
- CASTALDO, D. J. and D. V. MAURICE (1988)
Calcitriol and egg shell strength in layers.
PSA and SPSS Abstracts
Poult. Sci. 67, Supplement 1, p 65
- BRONSTEIN, I.N., K.A. SEMENDJAJEW (1987)
Taschenbuch der Mathematik
Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/M., pp. 687-688
- CHAH, C.C. and E.T. MORAN JR. (1985)
Egg characteristics of high performance hens at the end of lay when given cafeteria access to energy, protein and calcium.
Poult. Sci. 64, 1696-1712

CHRISTAKOS, S. and A.W. NORMAN (1980)

Vitamin D-dependent calcium binding protein synthesis by chick kidney and duodenal polysomes.
Arch. Biochem. Biophys. 203, 309-315

COHEN, A., A. BAR, V. ESNER and S. HURWITZ (1978)

Calcium absorption, calcium-binding protein and eggshell quality in laying hens fed hydroxylated vitamin D derivatives.

Poult. Sci. 57, 1646-1651

CORRADINO, R.A., R.H. WASSERMAN, M.H. PUBOLS and S.I. CHANG (1968)

Vitamin D induction of calcium-binding protein in the uterus of the laying hen.

Arch. Biochem. Biophys. 125, 378-380

CORRADINO, R.A. and R.H. WASSERMAN (1971)

Vitamin D₃: Induction of calcium-binding protein in embryonic chick intestine in vitro.

Science 172, 731-733

CORVOL, M.T., M.F. DUMONTIER, A. ULMANN, M. GARABEDIAN and G. WITTMER (1979)

Nuclear binding of 24,25-OH)₂-D₃ and its effect of DNA polymerase activities in cultured chondrocytes.

In: Vitmin D: Basic Research and Its Clinical Application,

Walter de Gruyter, Berlin, pp. 419-424

COTY, W.A. (1980)

A specific, high affinity binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D in the chick oviduct shell gland.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 285-292

DeLUCA, H.F., M. NAKADA, Y. TANAKA, R. SICINSKI and
M. PHELPS (1988)

The plasma binding protein for vitamin D is a site
of discrimination against vitamin D₂ compounds by
the chick.

Biochimica et Biophysica Acta 965, 16-21

EMERY, D.A. , P. VOHRA, R.A. ERNST and S.R. MORRISON
(1984)

The effect of cyclic and constant ambient
temperatures on feed consumption, egg production,
egg weight, and shell thickness of hens.

Poult. Sci. 63, 2027-2035

FAGAN, W.E., D.J. BUCKLEY and C.P.W. TSANG (1988)

Research note: Electronic eggshell thickness
gauge.

Poult. Sci. 67, 1105-1108

FARMER, M., D.A. Sr. ROLAND and A.J. CLARK (1986)

Influence of time of calcium intake on bone and
dietary calcium utilization.

Poult. Sci. 65, 555-558

FLURY, W. und B. HALDIMANN (1981)

Therapie mit Vitamin D und D-Metaboliten.

Schweiz. Med. Wschr. 111, 314-321

FULLMER, C.S. and R.H. WASSERMAN (1973)

Bovine intestinal calcium-binding proteins:
Purification and some properties.

Biochimica et Biophysica Acta 317, 172-186

FULLMER, C.S. and R.H. WASSERMAN (1975)

Isolation and partial characterisation of intestinal calcium-binding proteins from the cow, pig, horse, guinea pig and chick.

Biochimica et Biophysica Acta 393, 134-142

FULLMER, C.S., M.E. BRINDAK, A. BAR and R.H. WASSERMAN (1976)

The purification of calcium-binding protein from the uterus of the laying hen.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152, 237-241

GARABEDIAN, M., M. LIEBERHERR, T.M. N'GUYEN, M.T. GORBOL, M.B. DUBOIS and S. BALSAN (1978)

In vitro production and activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol in cartilage and calvarium.

Clin. Orthop. Rel. Res. 135, 241-248

GOODSON-WILLIAMS, R., D.A. Sr. ROLAND, and J.A. MCGUIRE (1986)

Effect of feeding graded levels of vitamin D₃ on egg shell pimpling in aged hens.

Poult. Sci. 65, 1556-1560

GRAY, R.W., T.L. GORTHWAITE and C.S. PHILLIPS (1983)

Groth hormon and triiodothyronine permit an increase in plasma 1,25-(OH)₂-D₃ concentrations in response to dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats.

Calcif. Tissue Int. 35, 100-106

GROPP J. und H. ZUCKER (1969)

Vitamin D-Bedarfsstudie an der japanischen Wachtel.

Vortrag, Kurzfassung in:

Z. Tierphys. Tierernährg. und Futtermittelkde. 25,
121-122

GROPP J. und H. ZUCKER (1971)

Vitamin D₃-Bestimmung im biologischen Verfahren an der japanischen Wachtel.

Arch. Geflügelkde. 35, 41-45

HARMS, R. H., H. R. WILSON and R. D. MILES (1988)

Research Note: Influence of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ on the performance of commercial laying hens.

Poult. Sci. 67, 1233-1235

HÄRTEL, H. (1988)

Beschreibung eines durch Vitamin-D₃-Entzug entstandenen Fütterungsschadens bei einem Ca/P-Legehennenversuch.

Kraftfutter, Monatszeitung für Futtermittel-Wirtschaft, 71, Heft 1

HAMILTON, R.M.G. (1982)

Methods and factors that offert the measurement of egg shell quality.

Poult. Sci. 61, 2022-2039

HAMILTON, R.M.G. and B.K. THOMPSON (1984)

Observation on dayly variation in feed intake and shell strength of eggs from White Leghorn pullets and force molted hens.

Poult. Sci. 63, 2335-2344

HAMILTON, R.M.G., R.W. FAIRFULL and R.W. GOWE (1985)

Use of particulate limestone or oyster shell in the dietary regimen of White Leghorn hens.

Poult. Sci. 64, 1750-1762

HARDEN, D., R. KUMAR, M.F. HOLICK and H.F. DeLUCA (1976)

Side-chain metabolism of 25-hydroxy-[26,27-¹⁴C]-vitamin D₃ in vivo.

Science 193, 493-494

HAUSSLER, M.R., C.A. DONALDSON, S.L. MARION, E.A. ALLEGRETTO, M.A. KELLY, D.J. MANGELSDORF and J.W. PIKE (1986)

Receptors for the vitamin D hormone: characterization and functional involvement in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated events.

In: The Role of Receptors in Biology and Medicine (Ed: Gotto, A.M. and B.W. D'Halley, eds)

Raven Press, New York, pp. 91-104

HEMPE, J.M., R.C. LAUXEN and J.E. SAVAGE (1988)

Rapid determination of weight and specific gravity using a computerized data collection system.

Poult. Sci. 67, 902-907

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1974)

Renal 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase:
involvement of cytochrom P 450 and other
properties.

J. Biol. Chem. 249, 7529-7535

HENRY, H.L., A.N. TAYLOR and A.W. NORMAN (1977)

Response on chick parathyroid glands to the
vitamin D metabolites 1,25-dihydroxychole-
calciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol.

J. Nutr. 107, 1918-1926

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1978)

Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are
required for normal chicken egg hatchability.

Science 201, 835-837

HENRY, H.L. (1981)

Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxy-
vitamin D₃ in vivo and in primary cultures of
chick kidney cells.

J. Biol. Chem. 254, 2722-2729

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984)

Vitamin D: metabolism and biological actions.

Annu. Rev. Nutr. 4, 493-520

HOLICK, M.F.H., K. SCHNOES, H.F. DeLUCA, R.W. GRAY,
I.T. BOYLE and T. SUDA (1972)

Isolation and identification of
24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of
vitamin D₃ made in the kidney.

Biochemistry 11, 4251-4255

- HOYLE, C.M. and J.D. GARLICH (1987)
Effect of a high fat diet fed prior to or at sexual maturity on egg weight.
Poult. Sci. 66, 1202-1207
- HUGHES, B.O., A.B. GILBERT and M.F. BROWN (1986)
Categorisation and causes of abnormal egg shells: relationship with stress.
British Poultry Science 27, 325-337
- HUGHES, R.J. (1988)
Inter-relationships between egg shell quality, blood acid base balance and dietary electrolytes.
World's Poultry Science J. 44, 30-40
- JACKSON, M.E., H.M. HELLWIG and P.W. WALDROUP (1987)
Shell quality: potential for improvement by dietary means and relationship with egg size.
Poult. Sci. 66, 1208-1213
- JARNAGIN, K., S.-Y. ZENG, M. PHELPS and H.F. DeLUCA (1985)
Metabolism and pharmacokinetics of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in the vitamin D₃-replete rat.
J. Biol. Chem. 260, 13625-13630
- KARUNAJEEWA, H. and S.H. THAM (1987)
The effect of rice pollard and manganese levels in diet on egg weight, shell quality and performance of crossbred layers.
J. of the Science of Food and Agriculture 41, 141-152

- KHAI TOV, D.R., V.A. PALIEV and K.V. I RGASHEV (1986)
 Effect of lucerne yuice on egg yield of hens on
 some measures of egg quality.
 Trudy Uzbekskogo Nauchno-issledovatel'skogo i
 Veterinargono Instituta 40, 96-100
- KLINGENSMITH, P.M. and P.Y. HESTER (1985)
 Effects of an induced molt and shell quality on
 the physical dimensions and mineral composition of
 eggs and intrauterine pH.
 Poult. Sci. 64, 2368-2376
- KONDO, K., T. YAMAZAKI, T. KAWAMURA and C. YAMASHITA
 (1985)
 Studies on feeding by mechanical poultry feeder
 for laying hen. 1. Effect of frequency of feeding
 on egg production.
 Res. Bul. of the Aicha-hen agricultural Res. Cen.
 17, 463-467 (Abstract)
- KOPP, M. (1985)
 Natürliche und synthetische Vitamin D-Metaboliten
 im Wachteleischalentest.
 Vet. Med. Diss., München
- KOVAC, M. and M. ANGELOVICOVA (1986)
 Following of the effect of metabolizable energy on
 some quality indices of the egg shell and eggs.
 In: Seventh European Poultry Conference, Paris
 1986 Volume 1. General, genetics, nutrition,
 posters.
 (Ed. M. Larbier), pp. 558-562

- KUMAR, R., D. HARNDEN and H.F. DeLUCA (1976)
Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: evidence for site chain oxidation.
Biochemistry 15, 2420-2423
- KUMAR, R., D. HARNDEN and H.F. DeLUCA (1978)
Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.
J. Biol. Chem. 253, 3804-3809
- LENNARD, R., D.A. Sr. ROLAND and J.A. McGUIRE (1981)
The relationship of serum calcium to shell weight and other criteria in hens laying a low or high incidence of shell-less eggs.
Poult. Sci. 60, 2501-2505
- LIU, S.T., J.X. LUO, Q.G. WANG, S.Q. NI, P.X. DING, Y.B. SUN and J.Y. LIU (1987)
Some factors affecting the quality of hen egg shells.
Animal Husbandary and Veterinary Medicine 19, 248-250
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951)
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- MÄNNER, K. (1982)
Auswirkungen hoher Umgebungstemperaturen auf physiologische und zootechnische Parameter von Legehennen.
Übersichten zur Tierernährung 10, 1-50

MAKLED, M.N. and O.W. CHARLES (1987)

Eggshell quality as influenced by sodium bicarbonate, calcium source, and photoperiod.

Poult. Sci. 66, 705-712

MALLUCHE, H.H., H. HENRY, W. MEYER-SABELLEK, D. SHERMAN, S.G. MASSRY and A.W. NORMAN (1980)

Effects and interactions of $24R,25-(OH)_2-D_3$ and $1,25-(OH)_2-D_3$ on bone.

Am. J. Physiol. 238, 494-498

MAYER, E., J.E. BISHOP, R.A. SCHANDRARATNA, W.H. OKAMURA, J.R. KRUSE, G. POPJAK, N. OHNUMA and A.W. NORMAN (1983)

Studies on the metabolism of calciferol XXIV. Isolation and identification of $1,25$ -dihydroxy- 24 -oxo-vitamin D_3 and $1,23,25$ -trihydroxy- 24 -oxo-vitamin D_3 .

J. Biol. Chem. 258, 13458-13465

MELANCON, M.H. and H.F. DeLUCA (1970)

Vitamin D stimulation of calcium-dependent adenosine triphosphatase in chick intestinal brush borders.

Biochemistry 9, 1658-1664

MERKE, J. and A.W. NORMAN (1981)

Studies on the mode of action of calciferol XXXII. Evidence for a $24R,25-(OH)_2$ -Vitamin D_3 receptor in the parathyreoid gland of the rachitic chick.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 551-558

- MIDGLEY, M., T.R. MORRIS and E.A. BUTLER (1988)
Experiments with the Bio-mittent lighting system
for laying hens.
British Poultry Science 29, 333-342
- MILES, R.D., P.T. COSTA and R.H. HARMS (1983)
The influence of dietary phosphorus level on
laying hen performance, egg shell quality and
various blood parameters.
Poult. Sci. 62, 1033-1037
- MONTELUCCI, G., A. BAR, G. RISENFELD and S. HURWITZ
(1977)
The response of 25-hydroxycholecalciferol-1-
-hydroxylase activity, intestinal calcium
absorption and calcium binding protein in
phosphate deficiency in chicks.
Comp. Biochem. Physiol. 57, 331-334
- MORAN, E.T.,JR. (1986)
Egg quality and hen performance to protein-calcium
deficiency, cafeteria feeding, and cage density.
Poult. Sci. 65, 1153-1162
- MORRIS, K.M.L., S.A. JENKINS and J.P. SIMONITE (1977)
The effect on egg shell thickness of the inclusion
of the alcingenic plant "Solanum malacoxylon" in
the diet of laying hens.
Vet. Rec. 101, 502-504
- MORRIS, T.R. (1985)
The manipulation of egg size and egg quality.
South African J. of Animal Science 15, 120-122

- MORRIS, T.R. and R.M. GOUS (1988)
Partitioning of the response to protein between
egg number and egg weight.
British Poultry Science 29, 93-99
- MORRIS, T.R., M. MIDGLEY and E.A. BUTLER (1988)
Experiments with the Cornell intermittent lighting
system for laying hens.
British Poultry Science 29, 325-332
- MORRISEY, R.L., D.T. ZOLOCK, D.A. BICKLE, R.N. EMPSON
and T.J. BUCCI (1978)
Intestinal response to 1,25-dihydroxychole-
calciferol I. RNA polymerase, alkaline
phosphatase, calcium and phosphorus uptake in
vitro, and in vivo calcium transport and
accumulation.
Biochimica et Biophysica Acta 538, 23-33
- MUELLER, C.D. and H.M. SCOTT (1940)
The porosity of the egg shell in relationship to
hatchability.
Poult. Sci. 19, 163-166
- NARBAITZ, R., C.P.W. TSANG, A.A. GRUNDER and J.H.
SOARES, Jr. (1987)
Scanning electron microscopy of thin and soft
shells induced by feeding calcium-deficient or
vitamin D-deficient diets to laying hens.
Poult. Sci. 66, 341-347

- NAPOLI, J.L., B.C. PRAMANIK, P.M. ROYAL, T.A. REINHARDT and R.L. HORST (1983)
 Intestinal synthesis of 24-keto-1,25-dihydroxyvitamin D₃. A metabolite formed in vivo with high affinity for the vitamin D cytosolic receptor.
 J. Biol. Chem. 258, 9100-9107
- N.N. in CANADA, AGRICULTURE CANADA (1987)
 Eggshell quality.
 In Research Branch Report 1986
 Ottawa, Canada, pp 50-51
- NORMAN, A.W., A.K. MIRCHEFF, T.H. ADAMS and A. SPIELVOGEL (1970)
 Studies on the mechanism of action of calciferol III. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity.
 Biochimica et Biophysica Acta 215, 348-359
- NORMAN, A.W. (1979)
 Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone.
 Academic Press, New York
- NORMAN, A.W., H.L. HENRY and H.M. MALLUCHE (1980)
 24R,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ are both indispensable for calcium and phosphorus homeostasis.
 Life Sci. 27, 229-237
- NORMAN, A.W., J. ROTH and L. ORCI (1982)
 The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium binding protein).
 Endocrinol. Rev. 3, 331-366

NORMAN, A.W., V.L. LEATHERS and J.E. BISHOP (1983)

Normal egg hatchability requires the simultaneous administration to the hen of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and 24R,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Nutr. 113, 2505-2515

NORMAN, A.W. (1987)

Studies on the vitamin D endocrine system in the avian.

J. Nutr. 117, 797-807

OHNUMA, N., K. BANNAI, H. YAMAGUCHI, Y. HASHIMOTO and A.W. NORMAN (1980)

Isolation of a new metabolite of vitamin D produced in vivo, 1,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone.

Arch. Biochem. Biophys. 204, 387-391

OUSTERHOUT, L.E. (1980)

Effect of calcium and phosphorus levels on egg weight and egg shell quality in laying hens.

Poult. Sci. 59, 1480-1484

ÖZPINAR, A. (1987)

The relationship between serum Ca, P and Mg levels with the performance of egg shell in layers kept in cages.

Doga Veterinerlik ve Hayvancilik 11, 243-254

POTTS, P.L. Sr. and K.H. WASHBURN (1985)

Genetic variation in shell strength and its relationship to egg size.

Poult. Sci. 64, 1249-1256

PROUDFOOT, F.G. and H.W. HULAN (1987)

Effect on shell strength of feeding supplemental sources of calcium to adult laying hens given insoluble grit during the rearing period.

British Poultry Science 28, 381-386

RAHN, H., V.L. CHRISTENSEN and F.W. EDENS (1981)

Changes in shell conductance, pores, and physical dimensions of egg and egg shell during the first breeding cycle of turkey hens.

Poult. Sci. 60, 2536-2541

RAMBECK, W.A., H. WEISER, R. HASELBAUER and H. ZUCKER (1981)

Vitamin D activity of different vitamin D₃-esters in chicken, Japanese quail and in rats.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 353-358

RAMBECK, W.A. and H. ZUCKER (1985)

Synergistic effects of 1,25-(OH)₂-D₃ and 24,25-(OH)₂-D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 799-804

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER and H. ZUCKER (1986)

1,24,25-(OH)₃-D₃ increases the bioactivity of 1,25-(OH)₂-D₃.

IX th International conference on calcium regulating hormones and bone metabolism. Abstract 405.

October 25 - November 1, 1986, Nizza, France

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER and H. ZUCKER (1988)

Synergistic effects of vitamin D metabolites.

Ann. Nutr. Metab. 32, 108-111

RAMBECK, W.A., C. GROGAN, J. MOHN, H. ZUCKER and
H.WEISER (1989)

Biological activity of deuterated and fluorinated
analogs of 1,25-(OH)₂-D₃.

2 nd International Symposium

Calcium 89

Prag, 27.-30. Juni 1989

ROLAND, D.A. Sr. (1978)

The incidence of body-checked and misshapen eggs
in relation to the number of hens per cage and
time of oviposition.

Poult. Sci. 57, 1705-1709

ROLAND, D.A. Sr. (1980)

Egg shell quality. I. Effect of dietary
manipulation of protein, amino acids, energy and
calcium in aged hens on egg weight, shell weight,
shell quality and egg production.

Poult. Sci. 59, 2038-2046

ROLAND, D.A. Sr. (1984)

Egg shell quality I: The body checked egg.

World's Poultry Science 40, 250-255

ROLAND, D.A. Sr. and M. FARMER (1984)

Egg shell quality II: Importance of time of
calcium intake with emphasis on broiler breeders.

World's Poultry Science 40, 255-260

ROLAND, D.A. Sr. (1986a)

Egg shell quality. III. Calcium and Phosphorus
requirements of commercial Leghorns.

World's Poultry Science 42, 154-165

ROLAND, D.A. Sr. (1986b)

Egg shell quality. IV. Oystershell versus limestone and the importance of particle size or solubility of calcium source.

World's Poultry Science 42, 166-171

ROLAND, D.A. Sr. and M. FARMER (1986)

Studies concerning possible explanations for the varying response of different phosphorus levels on egg shell quality.

Poult. Sci. 65, 956-963

ROUSH, W.B. and M. MYLET (1986)

Effect of water softening, water devices, and dietary salt level on the performance of caged single comb White Leghorn laying hens.

Poult. Sci. 65, 1866-1871

SCHOLTYSSER, S. (1986)

Feeding laying hens on a layers diet or a "shell" diet at different times of the day.

In: Seventh European Poultry Conference, Paris 1986 Volume 1. General, genetics, nutrition, posters.

(Ed. M. Larbier), pp. 563-569

SHANAWANY, M.M. (1982)

The effect of ahemeral light and dark cycles on the performance of laying hens - a review.

World's Poultry Science 38, 120-126

SHEN, H.J., D. SUMMERS and S. LEESON (1981)

Egg production and shell quality of layers fed various levels of vitamin D₃.

Poult. Sci. 60, 1485-1490

- SHEN, H.J., D. SUMMERS and S. LEESON (1982)
Influence of a vitamin D deficiency on egg shell,
membrane and egg shell weight.
Poult. Sci. 61, 746-749
- SOARES, J.H., D.M. KAETZEL, J.T. ALLEN and M.R. SWERDEL
(1982)
Toxicity of vitamin D₃ steroids to laying hens.
Poult. Sci. 62, 24-29
- SOMJEN, D., G.J. SOMJEN, Y. WEISMAN and I. BINDERMAN
(1982)
Evidence for 24,25-dihydroxycholecalciferol
receptors in long bones of newborn rats, and in
chick embryo limb-bud cells.
Biochem. J. 204, 31-36
- SPENCER, R., M. CHARMAN and D.E.M. LAWSON (1978)
Stimulation of intestinal calcium-binding protein
mRNA synthesis in the nucleus of vitamin
D-deficient chicks by 1,25-dihydroxy-
cholecalciferol.
Biochem. J. 175, 1089-1094
- TANAKA, Y., Y.K. WICHMANN, H.E. PAAREN, H.K. SCHNOES
and H.F. DeLUCA (1980)
Role of kidney tissue in the production of
25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone and
1,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone.
Proc. natn. Acad. Sci. USA 77, 6411-6414
[Abstract]

TAYLOR, A.N. and R.H. WASSERMAN (1967)

Vitamin D₃ induced calcium binding protein:
Partial purification, electrophoretic visualisation and tissue distribution.

Arch. Biochem. Biophys. 119, 536-540

THOMPSON, B.K. and R.M.G. HAMILTON (1986)

Relationships between laboratory measures of shell strength and breakage of eggs collected at a commercial grading station.

Poult. Sci. 65, 1877-1885

TSANG, C. P. W., N. DAGHIR and M. USKOKOVIC (1988)

The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ added to a ration containing adequate amounts of vitamin D₃ on layer performance.

PSA and SPSS Abstracts

Poult. Sci. 67, Supplement 1, p 166

USKOKOVIC, M.R., E. BAGGIOLINI, A. BATCHO, S.-J.

SHIUEY, P. WOJKULICH and R.L. HORST (1988)

Synthesis of 26,27-hexadeutero and epimeric 26-trideutero 1,25-dihydroxycholecalciferols.

Vitamin D: Molecular, cellular and clinical endocrinology - Proceeding of the seventh workshop on vitamin D

Rancho Mirage, California; USA

Walter de Gruyter, Berlin, New York

VOGT, H., K.H. ÜBERSCHÄR and S. MATTHES (1986)

Influence of toxic heavy metals on egg quality.

In: Seventh European Poultry Conference, Paris 1986 Volume 1. General, genetics, nutrition, posters.

(Ed. M. Larbier), pp. 570-573

WALTERS, M.R. (1985)

Steroid receptors and the nucleus.
Endocrinol. Rev. 6, 512-543

WASSERMAN, R.H. and A.N. TAYLOR (1966)

Vitamin D₃-induced calcium-binding protein in
chick intestinal mucosa.
Science 152, 791-793

WASSERMAN, R.H. and R. CORRADINO (1973)

Vitamin D, calcium and protein synthesis.
Vitamins and Hormones 31, 43-103

WECKSLER, W.R., W.H. OKAMURA and A.W. NORMAN (1978)

Studies on the mode of action of vitamin D XIV.
Quantitative assessment of the structural
requirements for the interaction of
1,25-dihydroxyvitamin D₃ with chick intestinal
mucosal receptor system.
J. Steroid. Biochem. 9, 929-937

WEISER, H. und M. SCHLACHTER (1986)

Die kombinierte Anwendung von Vitamin D₃, Vitamin
D₃-Metaboliten und Vitamin C.
Deutsche Gesellschaft für Osteologie, Abstracts
2. Tagung vom 24.-27. ept. 1986, Berlin

WEISER, H., M. SCHLACHTER and H. BACHMANN (1988)

The importance of vitamin C for hydroxylation of vitamin D₃ to 1,25-(OH)₂-D₃ and of 24R,25-(OH)₂-D₃ to a more active metabolite.

Vitamin D: Molecular, cellular and clinical endocrinology

(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, H.G. Grigoleit, D. v. Herrath)

Walter de Gruyter, Berlin / New York

WEISER, H., M. SCHLACHTER, H. P. PROBST and H. ZUCKER (1989)

The transformation of 24R,25-(OH)₂-D₃ to a more active metabolite by vitamin C.

In: Calcified Tissue International

Abstracts of the XXI European Symposium on Calcified Tissues

12 - 16 March 1989

Jerusalem Israel

WICHMANN, J.K., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES, R.L. HORST, R.M. SHEPARD and N.A. JORGENSEN (1979)

25-Hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone: a new in vivo metabolite of vitamin D.

Biochemistry 18, 4774-4780

WILSON, O.W. and E.M. LAWSON (1978)

Incorporation of 3H-leucine into an action-like protein in response to 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in chick intestinal brush borders.

Biochem. J. 173, 627-631

YAMADA, S., M. OHMORI, H. TAKAYAMA, Y. TAKASAKI and T. SUDA (1983)

Isolation and identification of 1 - and 23-hydroxylated metabolites of 25-hydroxy-24-oxo-vitamin D₃ from in vitro incubated chick kidney homogenates.

J. Biol. Chem. 258, 457-463

YAMADA, S., E. INO, H. TAKAYAMA, N. MORIUCHI, T. SHINKI, T. SUDA, G. JONES and H.F. DeLUCA (1985)

Differences in the side-chain metabolism of vitamin D₃ between chickens and rats.

Proc. natn. Acad. Sci. USA 82, 7485-7489
[Abstract]

ZUCKER H. und J. GROPP (1968)

Vitamin D₃-Bestimmung über die Eischalenbildung bei der japanischen Wachtel.

Naturwiss. 55, 447-455

Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W. A. Rambeck für seinen stets gerne gewährten Rat bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit und seine menschlich nette Art der Betreuung.

Für das hervorragende Arbeitsklima im Institut, sowie ihre immer freundliche und humorvolle Art der Hilfestellung bei allen Problemen danke ich vor allem Fr. Wetzel (04.06.42 ± ?).

Für ihre Hilfsbereitschaft während des Legehennenversuchs gilt mein Dank Frl. Engelfried.

Für ihre bereitwillige Mithilfe am Versuchsende und für die nette Atmosphäre im Institut danke ich den Kolleginnen und Kollegen C. Schuwerk, B. Kohn, E. Thomann, I. v. Rassler und Frl. Uhlein.

Prof. Gropp danke ich für die Bereitstellung der Versuchsstallungen, sowie für seine fachliche Kompetenz bei der Zusammenstellung der Futterrationen.

Fr. Stadler möchte ich besonders herzlich für ihre organisatorische Unterstützung und das nette Arbeitsklima auf der Abteilung Oberwiesenfeld danken. Den Tierpflegern im Oberwiesenfeld danke ich für Rat und tätige Mithilfe bei den praktischen Teilen der Versuche.

Herrn M. Göth danke ich für seine PC-Bereitstellung und seine fachliche qualifizierte Beratung bei dessen Bedienung. Frl. B. Fuchs gilt mein Dank für die strengen Korrekturen und die seelische Betreuung.

LEBENS LAUF

Michael Andreas Lehner

17.10.1962	geboren in Wangen im Allgäu Vater: Erich Lehner, Lehrer Mutter: Eleonore Lehner, Lehrerin geb. Polnitzky
1969-1973	Volksschule Opfenbach
1973-1982	Gymnasium Lindenberg/Allgäu
1982	Abitur
1982-1987	Studium der Tiermedizin an der LMU München
November 1987	Staatsexamen
Januar 1988	Approbation als Tierarzt
Mai 1988	Beginn der Arbeiten der vorliegenden Dissertation
August 1988- Januar 1989	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physio- logie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärzt- lichen Fakultät der LMU München

